

MYCOPLASMA PNEUMONIAE: EEN ZELDZAME ZIEKTEKIEM?

Diagnostiek en sero-epidemiologisch onderzoek
van infectie met *Mycoplasma pneumoniae* door middel
van enzyme immuno-assay (ELISA)

ELLY A. M. M. VAN DER MEULEN

MYCOPLASMA PNEUMONIAE:
EEN ZELDZAME ZIEKTEKIEM?

Diagnostiek en sero-epidemiologisch onderzoek
van infectie met Mycoplasma pneumoniae door middel
van enzyme immuno-assay (ELISA)

MYCOPLASMA PNEUMONIAE:
A RARE PATHOGEN?

Diagnosis and sero-epidemiology
of Mycoplasma pneumoniae infection by
enzyme immuno-assay (ELISA)

With a summary in English

Voor Han, Arjanne en Eric

VOORWOORD

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek werd verricht in het Instituut voor Medische Microbiologie (hoofd: Prof. Dr. J. van der Veen) van het St. Radboudziekenhuis, Katholieke Universiteit te Nijmegen.

Een proefschrift wordt wel beschouwd als het sluitstuk van de wetenschappelijke opleiding. Zo gezien heeft deze opleiding mij langs veel omwegen, over heuvels, maar ook door dalen, tot dit punt gevoerd. Velen hebben mij op die weg op één of andere manier bijgestaan. Hen allen wil ik hiervoor danken.

Een aantal van degenen, die rechtstreeks tot de totstandkoming van deze dissertatie hebben bijgedragen, wil ik met name noemen.

De intensieve en kritische dialogen met Frans Heessen -die ook de bereiding van het antigeen onder zijn hoede had-, met Ton van Loon -van wie ik de techniek van de ELISA leerde- en vooral ook met Jos van der Logt vormen een blijvende herinnering.

De aanvankelijk moeizame, maar allengs tot beter onderling begrip voerende discussies met Hans van Druten en Ruurd de Graaf (van de Mathematisch-Statistische Adviesafdeling) leidden, mede dankzij de hulp van Albert Reintjes, tot een vruchtbaar resultaat.

Zonder de computerfaciliteiten van de afdeling Signaal- en Data Analyse, en in het bijzonder de hulp van Frans Smolders, was dit proefschrift nauwelijks mogelijk geweest.

Ik dank de patiënten, die herhaaldelijk bloed voor onderzoek lieten afnemen. Ook dank ik de medische staf van "De Binckhorst" -die veel werk verzetten, dat in dit proefschrift slechts gedeeltelijk tot zijn recht komt- en de medewerkers van de afdeling Virologie van het Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid in Tilburg en van de afdeling Toxoplasma-onderzoek van het Instituut voor Medische Microbiologie voor het verzamelen en opzoeken van materiaal voor onderzoek en van de bijbehorende patiëntengegevens.

Verschillende medewerkers van de afdeling Virologie, evenals de medewerkster van de bibliotheek, Gerry Hermkens, verleenden gewaardeerde hulp bij onderdelen van het onderzoek.

Ella Driessen wil ik bedanken voor de nauwgezette wijze waarop ze het grootste deel van de laboratoriumonderzoeken, in het bijzonder van de ELISA, verrichtte.

De heer J. Konings vervaardigde, in een prettige samenwerking, de tekeningen.

Marjon van Omme-Brouwer dank ik voor de zorgvuldige manier, waarop ze het vele typwerk, in het bijzonder van dit manuscript, verzorgde.

Tenslotte heb jij, Han, niet alleen door, samen met de kinderen, te zorgen voor de sfeer in huis, waarin werken aan dit onderzoek mogelijk was, maar ook door daadwerkelijke hulp op kritische momenten een onschatbaar aandeel in dit proefschrift.

INHOUD

LIJST VAN AFKORTINGEN	15
Hoofdstuk 1. INLEIDING	17
Geschiedenis	17
Taxonomie	18
Enkele eigenschappen	18
Antigene structuur	19
Klinische beelden	20
- Infecties van de luchtwegen	21
- Overige aandoeningen	22
- Mycoplasma pneumoniae en pancreatitis	23
- M. pneumoniae bij patiënten met stoornissen in de immuun-afweer	24
- Letale infecties	25
Pathologische anatomie	25
Laboratoriumdiagnose	26
- Serologische methoden	27
Therapie	29
Preventie	30
Epidemiologie	31
- Verdeling over leeftijd en geslacht	31
- Transmissie	33
Immunologische aspecten van infectie met M. pneumoniae	34
- Ontwikkeling van ontstekingsverschijnselen bij proefdieren	34
- Antilichamen	35
- Phagocytose	36
- Lymphocyten	37
- Auto-antilichamen	37
- Koude agglutinen	38
Pathogenese	40
ELISA	42
Doel van het onderzoek	44

Hoofdstuk 2. MATERIAAL EN METHODEN	46
2.1. Kweekmedia	46
2.1.1. Vloeibare media	46
2.1.2. Agar	47
2.2. ELISA IgG en IgM (indirect)	47
2.2.1. Antigenen	47
2.2.2. Conjugaten	49
2.2.3. Substraat	49
2.2.4. Verdunningsmiddelen	49
2.2.5. Instrumenten	49
2.2.6. Procedure	50
2.2.7. Definiëring van de titers; ELISA-eenheden	51
2.2.8. Rekenprogramma voor titerberekeningen	52
2.3. Andere serologische onderzoeksmethoden	55
2.3.1. Complementbindingsreactie (CBR)	55
2.3.2. Indirecte haemagglutinatie (IHA)	55
2.3.3. Metabolic inhibition test (MIH)	56
2.4. Kweken van <i>M. pneumoniae</i>	57
2.4.1. Identificatie van de stammen	57
2.5. Sera	58
2.5.1. Sera, die waren ingestuurd voor onderzoek op toxoplasmose of hepatitis	58
2.5.2. Enkele groepen sera van patiënten, die waren ingestuurd voor onderzoek op respiratoire virussen	58
2.5.3. Sera van patiënten, bij wie een kweekproef was gedaan	59
2.5.4. Sera van 30 patiënten, die waren ingestuurd voor onderzoek op rheuma-factor	59
2.5.5. Sera voor sero-epidemiologisch onderzoek	59
2.6. Fractionering van sera in sucrose-gradiënten	61
2.7. Referentiesera	61
2.8. Statistische methoden	63
 Hoofdstuk 3. OPZET EN UITVOERING VAN DE ELISA VOOR MYCOPLASMA PNEUMONIAE	 64
3.1. Antigeen	64
3.2. ELISA-procedure: verdunningsvloeistoffen	65
3.3. Conclusie	66

Hoofdstuk 4. MATHEMATISCHE MODELLEN VOOR DE RELATIE TUSSEN EXTINCTIE EN SERUMVERDUNNING IN ELISA	67
Resultaten	69
- Positieve sera	70
- Negatieve sera	75
Discussie	78
 Hoofdstuk 5. NADER ONDERZOEK VAN DE ELISA	 82
5.1. Vaststelling van de grenswaarde voor berekening van titers	82
5.2. Effect van reductie van het aantal verdunningen	83
5.3. Vergelijking met controle-antigeen; grens tussen speci- fieke en aspecifieke reacties	86
5.4. Vergelijking met controle-antigeen: correlatie- onderzoek van positieve sera	89
5.5. Onderzoek naar de klasse-specificiteit van ELISA- IgG en -IgM	90
5.6. Competitie tussen IgM- en IgG-antilichamen	90
5.7. Oriënterend onderzoek naar de invloed van rheuma-factor	94
 Hoofdstuk 6. VERGELIJKING VAN DE ELISA MET BESTAANDE SEROLO- GISCHE METHODEN	 96
Discussie	104
Conclusie	105
 Hoofdstuk 7. SEROLOGISCH ONDERZOEK EN KWEKPROEVEN BIJ PATIËNTEN	 107
7.1. Onderzoek bij patiënten met pneumonie door M. pneumo- niae	108
7.2. Onderzoek bij patiënten zonder zekere diagnose	108
7.3. Verloop van antistoftiters in verschillende reacties	109
Conclusie	113
 Hoofdstuk 8. BETEKENIS VAN ELISA-IgM EN IHA VOOR DE DIAGNOS- TIEK VAN MYCOPLASMA PNEUMONIAE-INFECTIES	 114
Conclusie	120

Hoofdstuk 9. SERO-EPIDEMIOLOGISCH ONDERZOEK	121
9.1. Materiaal en methoden	122
9.2. Resultaten	123
9.2.1. Conjugaat, inactiveren van sera, verdeling van sera over seizoen	123
9.2.2. Positieve controlesera	124
9.2.3. Vergelijking van de titers van antistoffen tegen toxoplasma met antistofspiegels voor M. pneumoniae	127
9.2.4. Vergelijking van Orion-antigeen met eigen antigeen	127
9.2.5. Verdeling van antistoftiters (E.U.) naar leeftijd	127
9.2.6. Bepaling van de grens positief/negatief. Relatieve frequentie van positieve sera per leeftijdsgroep	131
9.2.7. Verdeling van positieve sera naar geslacht	132
9.2.8. Onderzoek van sera uit 1979	135
9.3. Discussie	137
9.4. Conclusie	140
 Hoofdstuk 10. EPIDEMIOLOGIE VAN MYCOPLASMA PNEUMONIAE- INFECTIE	142
10.1. Beschrijving van de waargenomen patronen	142
10.2. Berekeningen met de modellen van Muench	143
10.3. Model met primaire en secundaire infecties	148
10.4. Onderzoek van andere modellen met primaire en secundaire infecties	154
10.5. Discussie	157
10.6. Conclusie	163
 Bijlage I. THEORETISCHE OVERWEGINGEN BIJ ELISA	164
A. Reacties in de indirecte sandwich-ELISA voor antilichamen	164
B. Model volgens evenredigheden	164
C. Invloed van de evenwichtsreacties	166
D. Andere verstoringen van het verloop van de curve	168
E. Afleiding van de mathematische modellen en onderlinge vergelijking	172
F. Vergelijking met andere modellen	174

Bijlage II. THEORETISCHE ACHTERGRONDEN VAN DE BEREKENING VAN TITERS EN ELISA-EENHEDEN (E.U.) IN ELISA	176
SAMENVATTING	180
SUMMARY	183
LITERATUUR	188
CURRICULUM VITAE	196

LIJST VAN AFKORTINGEN

CBR	: complementbindingsreactie
CCU	: colour changing units
E.D.	: effective dose
EIA	: enzyme immuno-assay
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay
ELISA-IgG	: ELISA voor het aantonen van specifieke IgG-antilichamen
ELISA-IgM	: ELISA voor het aantonen van specifieke IgM-antilichamen
E.U.	: ELISA-units, ELISA-eenheden
E.U. IgG	: E.U. IgG-antilichamen, specifiek voor M. pneumoniae
E.U. IgM	: E.U. IgM-antilichamen, specifiek voor M. pneumoniae
FCS	: foetaal kalverserum
IF	: immunofluorescentie
IFT	: immunofluorescentietest
IHA	: indirecte haemagglutinatietest
KA	: koude agglutinatie
KAS	: (nuchter) kalverserum
LFT	: latex-fixatie test
M.	: Mycoplasma
MIH	: metabolic inhibition test
MN	: mononucleaire leukocyten
neg.	: negatief (controleserum)
OPD	: ortho-phenylenediamine
PAP	: primaire atypische pneumonie
PBS	: phosphate buffered saline
PMN	: polymorphonucleaire leukocyten
pos.	: positief (controleserum)
PPLO	: pleuropneumonia-like organism
RIA	: radio-immuno-assay
st. pos.	: sterk positief (controleserum)
TEU	: 2^{log} van het aantal ELISA-eenheden
TRI	: tetrazolium-reduction inhibition
zw. pos.	: zwak positief (controleserum)

INLEIDING

Mycoplasma (M.) *pneumoniae* veroorzaakt bij mensen luchtweg-infecties, in het bijzonder pneumonieën. Ernstige ziekten komen vooral voor bij oudere kinderen en jonge volwassenen; bij hen is *M. pneumoniae* één van de belangrijkste oorzaken van pneumonie. Bij jongere kinderen verlopen infecties in het algemeen minder ernstig.

GESCHIEDENIS

De geschiedenis van dit micro-organisme is nog relatief kort. In 1938 gaf Reimann (1938) de naam *primaire atypische pneumonie* (PAP) aan een groep pneumonieën die afweken van de typische pneumonieën veroorzaakt door de toen bekende micro-organismen. De ontdekking van de koude agglutinenen maakte een nauwkeurigere definitie van deze ziekte mogelijk (Peterson *et al.*, 1943).

Eaton *et al.* (1944) toonden aan dat katoenratten en hamsters die intranasaal met gefiltreerde sputummonsters van patiënten met PAP waren besmet, pneumonie kregen. De pneumonie kon worden voorkomen door het monster tevoren te mengen met serum van reconvalescenten. De filtreerbaarheid en ongevoeligheid voor penicilline wezen op een *viraal agens*. Nader onderzoek van dit "Eaton's agent" met behulp van kweek op kippeëmbryo's en immunofluorescentie op bronchiaal epitheel van deze embryo's gaven aanwijzingen dat het hierbij ging om een *Mycoplasma* (toen nog *pleuropneumonia-like organism*, PLO genoemd) (Liu, 1957; Clyde, 1961; Goodburn en Marmion, 1962).

Dit werd tenslotte bevestigd door Chanock *et al.* (1962), die er in slaagden het organisme op agar te kweken.

M. pneumoniae wordt gerekend tot de familie Mycoplasmataceae, orde Mycoplasmatales. De taxonomische positie van deze micro-organismen, die zich van bacteriën onderscheiden door het ontbreken van een celwand, is nog onzeker. Sommigen rekenen de Mycoplasmatales tot een aparte klasse, die der Mollicutes, binnen het rijk der prokaryoten, naast de "echte" bacteriën (Freundt en Edward, 1979).

Recent onderzoek van eigenschappen van prokaryoten -dat van het door fructose-diphosfaat geïnactiveerde lactaatdehydrogenase (Neimark, 1979) en sequentie-analyse van 16S-RNA (Fox *et al.*, 1980)- wijst echter op een nauwe verwantschap van de Mycoplasmataceae (die door deze auteurs werden onderzocht) en Gram-positieve eubacterië. Voor zover bekend zijn dit soort onderzoeken nog niet voor *M. pneumoniae* verricht. Wel is het bekend dat het guanine + cytosine gehalte van het DNA van *M. pneumoniae* 40% bedraagt en daarmee duidelijk hoger ligt dan dat van de overige Mycoplasmataceae (Neimark, 1979). Dit wijst op een geringe verwantschap met de andere Mycoplasmataceae.

ENKELE EIGENSCHAPPEN

M. pneumoniae is draadvormig met afmetingen van 0,075 x 1,8 μm (Collier en Clyde, 1971). Er zijn 3 delen te onderscheiden: (1) een frontale projectie ("tip structure"), (2) een dikker "lichaam" en (3) een langere "staart". Het organisme is enigszins beweeglijk. Het mechanisme hiervan is nog onduidelijk; de "tip structure" speelt hierin vermoedelijk een belangrijke rol en lijkt in ieder geval de richting van de beweging te bepalen. Ook speelt de "tip structure" een belangrijke rol bij de hechting van *M. pneumoniae* aan gastheercellen. De belangrijkste receptor bij de gastheercel is vermoedelijk neuraminezuur, hoewel neuraminidase de hechting aan erythrocyten niet voorkomt (Feldner *et al.*, 1979). *M. pneumoniae* bevat, evenals bacteriën, zowel DNA als RNA. Het genoom is ongeveer 5×10^8 daltons groot en daarmee ongeveer half zo groot als dat van de kleinste bacteriën (Freundt en

Edward, 1979). In tegenstelling tot bacteriën heeft *M. pneumoniae* geen celwand. Hierin komt het overeen met de L-vormen van bacteriën. Een aantal eigenschappen van *M. pneumoniae* komen dan ook overeen met die van L-vormen: de filtreerbaarheid, de ongevoeligheid voor penicilline en de behoefte aan een milieu met hoge osmolariteit. In tegenstelling tot de L-vormen die soms een celwand bezitten, zijn van *M. pneumoniae* en andere Mycoplasmata geen vormen met een celwand bekend. *M. pneumoniae* is hemolytisch. Deze eigenschap berust op vorming van peroxidase (Cohen en Somerson, 1967).

M. pneumoniae hecht zich sterk aan cellen o.a. aan erythrocyten (haemadsorptie). Van de eigenschap om zich aan glasoppervlak te hechten (Somerson *et al.*, 1967) wordt gebruik gemaakt om zuiverdere antigenen voor serologische proeven te bereiden (Eng, 1971).

ANTIGENE STRUCTUUR

De belangrijkste antigene determinanten van *M. pneumoniae* zijn aanwezig in of op het celmembraan. In de eerste plaats moet worden gewezen op de in vet oplosbare glycolipiden (Placket *et al.*, 1969). Zij zijn sterker immunogeen wanneer ze gebonden zijn aan membraaneiwwitten (Razin *et al.*, 1970 ii). De glycolipiden zouden ongeveer 10% van de lipide fractie van *M. pneumoniae* uitmaken (Pollack *et al.*, 1973). Ook tegen membraaneiwwitten zonder glycolipiden kunnen antilichamen worden gevormd (Razin *et al.*, 1970 ii), evenals tegen eiwwitten in de zgn. "soluble fraction" (het oplosbare deel van *M. pneumoniae*, na verwijdering van de membranen) (Pollack *et al.*, 1973).

Een immunologisch belangwekkend gegeven is het verschijnsel dat *M. pneumoniae* in staat is om eiwwitten, bv. serumeiwwitten, uit het kweekmedium op te nemen in het celmembraan. Vervolgens kunnen deze *M. pneumoniae* gedood worden met behulp van niet-geïnactiveerd antiserum tegen de betreffende eiwwitten (Sethi en Brandis, 1972).

De betekenis van glycolipiden als antigene determinanten blijkt onder meer uit *in vitro*-proeven met *M. pneumoniae*. Een bij proefdieren bereid antiserum tegen de lipide fractie van *M. pneu-*

moniae remt de groei van dit micro-organisme *in vitro*. Verder kunnen hierin complementbindende antistoffen worden aangetoond bij gebruik van complete *M. pneumoniae*-cellen. De groeiremming en complementbinding worden geblokkeerd door eerst gezuiverde glycolipiden van *M. pneumoniae* toe te voegen (Razin *et al.*, 1970 i, 1971). Antiserum tegen membraaneiwhitten bindt weliswaar eveneens complement in een complementbindingsreactie met complete *M. pneumoniae*-cellen, maar remt de groei van *M. pneumoniae* vrijwel niet (Razin *et al.*, 1970 ii). Antiserum tegen de "soluble fraction" van *M. pneumoniae* reageert nog slechter. De groei van *M. pneumoniae* wordt niet geremd en complement wordt nauwelijks gebonden in aanwezigheid van *M. pneumoniae*-cellen (Pollack *et al.*, 1973). Verder zij er op gewezen dat een bij proefdieren bereid antiserum tegen de glycolipide fractie van *M. pneumoniae* lysis van *M. pneumoniae* teweegbrengt na toevoeging van caviacomplement (Brunner *et al.*, 1971). Dezelfde reactie treedt op indien reconvalescentenserum van een patiënt met *M. pneumoniae*-infectie wordt gebruikt (Brunner *et al.*, 1971). Op grond van bovenstaande gegevens lijkt het waarschijnlijk dat antistoffen tegen glycolipiden verantwoordelijk zijn voor de lysis. Voor de lysis van *M. pneumoniae* is -in tegenstelling met lysis van bacteriën door antistoffen en complement- geen lysozyme nodig, waarschijnlijk omdat *M. pneumoniae* geen celwand heeft.

Voor de interpretatie van sommige onderzoekresultaten is het een probleem dat de glycolipiden van *M. pneumoniae* sterke kruisreacties tonen met glycolipiden van plantaardige oorsprong, bv. spinazie, wortels en peentjes (parsnips) (Kenny en Newton, 1973; Brunner *et al.*, 1977). De kruisreactie tussen *M. pneumoniae* en streptococcus MG die vroeger (voordat *M. pneumoniae* kon worden gekweekt) wel werd gebruikt om de primaire atypische pneumonieën nader te definiëren, blijkt te berusten op reacties met glycosylglyceriden van streptococcus MG (Plackett *et al.*, 1969).

KLINISCHE BEELDEN

M. pneumoniae veroorzaakt voornamelijk aandoeningen van de luchtwegen. Deze beginnen meestal geleidelijk met malaise, hoes-

ten en koorts. De belangrijkste syndromen zijn: pneumonie, tracheobronchitis, pharyngitis en bulleuze myringitis. Hiermee gecombineerd, of in sporadische gevallen zonder bovengenoemde tekenen van luchtweginfectie, kunnen optreden: otitis media, sinusitis, erythema multiforme (syndroom van Stevens-Johnson), urticariële en andere huidverschijnselen, myocarditis en meningo-encephalitis.

Infecties van de luchtwegen

De belangrijkste ziekte, *pneumonie*, is sterk wisselend in ernst en duur. De incubatietijd bedraagt ongeveer 15-25 dagen (Foy *et al.*, 1966 ii). Bijna obligaet voorkomende symptomen zijn: malaise (Hers en Masurel, 1967), hoesten en koorts (Couch, 1980). Het beeld bij röntgenologisch onderzoek van de longen is wisselend: van enige streep-tekening via een duidelijk interstitieel beeld of kleinvlekkige tekening tot uitgebreide lobaire of segmentale infiltraten met soms pleurareactie; deze afwijkingen zijn vaak éénzijdig en vooral in de onderkwabben gelocaliseerd. De prognose is vrijwel altijd gunstig, ook bij ernstig zieke patiënten. Secundaire infecties met o.a. H. influenzae kunnen voorkomen (Hers en Masurel, 1967). De genezing kan bespoedigd worden door behandeling met erythromycine of een van de tetracyclines. Rechutes kunnen voorkomen. Na een ernstige infectie kan nog langdurig malaise blijven bestaan. Ook na enkele jaren kunnen recidieven voorkomen (Foy *et al.*, 1971 i, 1971 ii). Een overzicht van de (begeleidende) ziekteverschijnselen en de relatieve frequentie ervan gaven o.a. Murray *et al.* (1975), Couch (1980) en Cassell en Cole (1981) en -voor wat betreft het ziektebeeld bij kinderen- Mok *et al.* (1979).

Naast pneumonie komen ook andere luchtweginfecties voor, vooral *tracheobronchitis* en *pharyngitis*. De frequentie hiervan, in relatie tot die van pneumonie, wordt zeer wisselend opgegeven. Dit hangt vermoedelijk samen met de selectie van de onderzochte patiënten. Hers en Masurel (1967) vonden dat bronchitis regelmatig bij ouderen (boven 30 jaar) voorkomt; dit in tegenstelling tot pneumonie. Zij vonden ook dat infectie met *M. pneumoniae* tot exacerbaties van asthma en van chronische bronchitis en emphyseem konden leiden. In andere gevallen blijven de verschijnselen be-

perkt tot keelpijn (pharyngitis) of zelfs helemaal achterwege, ondanks een serologisch of door middel van kweekproef aantoonbare infectie. Dit ziet men vooral bij kinderen onder 5 jaar. Zij kunnen gedurende 2-3 maanden drager zijn van *M. pneumoniae* zonder ziekteverschijnselen (Foy *et al.*, 1966 ii).

Rhinitis komt voor, maar slechts in ongeveer 25% van de gevallen (Foy *et al.*, 1966 ii; Hers en Masurel, 1967).

Oorontstekingen, vooral (bulleuze) *myringitis*, en *sinusitis* kunnen zelfstandig, of in combinatie met pneumonie, bronchitis of pharyngitis voorkomen.

Overige aandoeningen

Huidverschijnselen komen frequent voor. *Urticaria* wordt in 6-11% van de gevallen beschreven (Foy *et al.*, 1966 ii; Hers en Masurel, 1967; Cherry *et al.*, 1975; Mok *et al.*, 1979). Andere huidverschijnselen zijn zeldzamer: o.a. *erythema exsudativum multiforme* (Foy, 1966 i; Pönkä, 1978) en *erythema nodosum* (Purcell en Chanock, 1967).

Verder kunnen verschijnselen van de *tractus gastrointestinales*, te weten anorexie, misselijkheid en, meestal kortdurende, diarree en braken in het beloop van een infectie met *M. pneumoniae* voorkomen (Murray *et al.*, 1975).

Ook het *centrale zenuwstelsel* kan aangetast worden. Het meest frequent komt meningoencephalitis voor. Daarnaast zijn psychose, syndroom van Guillain en Barré en cerebellaire ataxie beschreven (Smith en Sangster, 1972; Murray *et al.*, 1975; le Bigot *et al.*, 1976; Kopelman, 1977). Van alle door virussen of *Mycoplasma* veroorzaakte neurologische aandoeningen, zoals die tussen 1967 en 1976 aan de WHO werden gerapporteerd, werd 1% door *M. pneumoniae* veroorzaakt. Bij 199 uit Nederland gerapporteerde gevallen kwamen geen infecties door *M. pneumoniae* voor (Assaad *et al.*, 1980).

Myocarditis en *pericarditis* van wisselende ernst komen voor (Naftalin, 1974; Murray *et al.*, 1975; Pönkä, 1979).

Verder zijn *arthralgieën* en, veel zeldzamer, *polyarthrititis* beschreven (Lambert, 1968; Jones, 1970; Hernandez *et al.*, 1977; van Griethuysen *et al.*, 1981).

In verhouding tot de frequent voorkomende koude agglutinen is de zeldzaamheid van *intravasculaire haemolyse* opvallend. Verder

zijn intra-vasculaire stolling en thrombocytopenische purpura beschreven (Couch, 1980).

Stoornissen van de *leverfuncties* kunnen bij infectie met *M. pneumoniae* voorkomen (Murray *et al.*, 1975).

Mycoplasma pneumoniae en pancreatitis

Bij alle tot nu toe beschreven complicaties werd de diagnose in het algemeen door serologisch onderzoek gesteld. In tenminste één geval bij elk van deze complicaties werd de diagnose door isolatie van *M. pneumoniae* bevestigd. Dit laatste geldt zover ons bekend, niet voor pancreatitis. Of er verband bestaat tussen infectie met *M. pneumoniae* en *pancreatitis* is niet zo duidelijk. Mårdh en Ursing (1974) beschreven 6 patiënten met acute pancreatitis, die meestal 1-2 weken na het begin van bronchopneumonie ontstond. Eén van de patiënten overleed in hyperosmolair en hyperglycemisch coma. Hoewel *M. pneumoniae* niet gekweekt werd, waren de longafwijkingen en serologische bevindingen (o.a. koude agglutinenen) sterke aanwijzingen voor infectie met *M. pneumoniae*. Oderda en Kraut (1980) beschreven een meisje van 22 maanden met pancreatitis en een 4-voudige titerstijging voor *M. pneumoniae*; zij had geen manifeste luchtweginfectie. De interpretatie van deze bevindingen is moeilijk.

Leinikki *et al.* (1973) vonden bij een groep van 60 patiënten met acute pancreatitis in de meeste gevallen een significante titerstijging in de complementbindingsreactie voor *M. pneumoniae*. Deze antilichamen bleken tot de IgM-klasse te behoren (Leinikki *et al.*, 1978). Koude agglutinenen waren afwezig of de titer was laag. Zij veronderstellen dat tijdens pancreatitis een antigene structuur vrijkomt, die complementbindende antistoffen tegen *M. pneumoniae* opwekt. Het gelukte echter vrijwel niet de reactie te blokkeren met lipide antigeen van pancreasweefsel, wel met antigeen van *Mycoplasma pneumoniae*. Wanneer de sera van deze patiënten worden onderzocht door middel van een ELISA met van glycolipide gezuiverd *M. pneumoniae*-antigeen, blijken bij hen nauwelijks titerstijgingen gevonden te worden (Räisänen *et al.*, 1980).

Deze bevindingen wijzen erop, dat *M. pneumoniae* in deze gevallen niet als oorzaak van pancreatitis mag worden beschouwd, ondanks de gevonden significante titerstijgingen ten opzichte van glyco-

lipide antigeen. Ditzelfde geldt misschien voor andere syndromen die met weefseldestructie gepaard gaan en waarbij titerstijgingen ten opzichte van glycolipide antigeen van *M. pneumoniae* worden gevonden.

M. pneumoniae bij patiënten met stoornissen in de immuun-afweer

Foy (1973 ii) beschreef 4 patiënten met verschillende vormen van hypogamma-globulinemieën die leden aan luchtweginfecties door *M. pneumoniae*. Hierbij viel het op dat de ziekte bij hen ernstiger en langduriger was en gepaard ging met groter gewichtsverlies dan bij patiënten met pneumonie door *M. pneumoniae* zonder hypogamma-globulinemie. Verder was opvallend dat de afwijkingen aan de longen gering waren; met name ontbraken noemenswaardige infiltraten. Dit zou er op kunnen wijzen dat antigeen-antilichaam-reacties een rol spelen bij het ontstaan van deze infiltraten bij immuno-competente patiënten. Bij twee van de vier patiënten kwamen langdurige erythemen voor. Na behandeling met erythromycine of tetracycline genazen de patiënten. Deze antibiotica zijn in principe bacteriostatisch; het is bekend dat door een dergelijke behandeling *M. pneumoniae* niet geëradiceerd wordt (Foy *et al.*, 1966 ii). Daarom veronderstellen de auteurs dat de cellulaire immuunrespons een rol heeft gespeeld bij de genezing van deze patiënten.

Taylor-Robinson *et al.* (1980) beschreven een 7-jarige jongen met hypogamma-globulinemie. *M. pneumoniae* bleef bij hem gedurende 2 jaar aantoonbaar, ondanks behandeling met erythromycine en tetracycline. Hij had consolidatie van de linker bovenkwab en een opheldering in de 2e linker rib; uit de riblaesie kon *M. pneumoniae* worden geïsoleerd. Ondanks een zeer langzaam herstel was de algemene toestand van deze patiënt redelijk.

Bij patiënten met *sikkelcel*-ziekte komen pneumonieën door *M. pneumoniae* voor die ernstiger verlopen dan gewoonlijk (Shulman *et al.*, 1972), zeker wanneer men de leeftijd (4-12 jaar) van de door deze auteurs beschreven patiënten in aanmerking neemt.

Ook bij het *syndroom van Down* lijken ernstigere ziekten voor te komen (Baernstein *et al.*, 1965).

Ondanks de gunstige prognose in het algemeen zijn een aantal dodelijke infecties met *M. pneumoniae* beschreven. Een overzicht van 10 gevallen uit de literatuur is onlangs door Koletsky en Weinstein (1980) gegeven, die hieraan een eigen geval toevoegen. In de meeste gevallen was er sprake van pneumonie (10/11). In 5 gevallen waren er afwijkingen van het centrale zenuwstelsel. Bij de patiënt die zij zelf vermelden, kon post mortem *M. pneumoniae* uit de trachea, longen en nieren worden geïsoleerd, ten teken van hematogene disseminatie van *M. pneumoniae*. Er waren hierbij geen specifieke afwijkingen in de longen en nieren aantoonbaar. Ook bij de niet door hen vermelde patiënt van Naftalin *et al.* (1974) waren tekenen van hematogene verspreiding. Hun patiënt overleed aan cardiale complicaties van *M. pneumoniae* en zij slaagden er in *M. pneumoniae* te isoleren uit bloed uit de ventrikel.

PATHOLOGISCHE ANATOMIE

Gezien het in de regel gunstige verloop van infecties met *M. pneumoniae* staan slechts weinig gegevens van pathologisch-anatomisch onderzoek ter beschikking. In de meeste gevallen had dit onderzoek betrekking op eindstadia. Men kan niet verwachten dat de uitkomsten hiervan veel licht zullen werpen op de natuurlijke evolutie van het ziekteproces.

De belangrijkste, relatief vaak vermelde afwijkingen waren: bloedingen, stuwingen en focale laesies in de longen met soms enig pleura-exsudaat. Dikke exsudaten bevonden zich in de bronchi en bronchioli, die ontstoken en geulcereerd waren. Microscopisch onderzoek toonde interstitiële pneumonie, bronchitis en bronchiolitis aan. Peribronchiaal werden mononucleaire infiltraten gezien. In de luchtwegen bevonden zich necrotische, epitheliale, mononucleaire en polymorphonucleaire cellen (PMN) en fibrine. De mate waarin de alveoli in het ziekteproces betrokken waren, wisselde; dit werd mogelijk (mede) veroorzaakt door secundaire bacteriële invasie. Ook andere organen waren in sommige gevallen aangedaan. Samenvattend tonen de longen dus het beeld van een desquamatieve, interstitiële pneumonie (Clyde, 1979).

De belangrijkste resultaten bij het routine-laboratorium-onderzoek zijn als volgt (Couch, 1980): het aantal leukocyten is meestal normaal, soms echter verhoogd. De differentiatie van de leukocyten toont meestal enige verschuiving naar links. De bezinkingssnelheid van de erythrocyten is meestal verhoogd, vaak zelfs in sterke mate. De hoeveelheid sputum is meestal gering en het is visceus. De Gram-kleuring laat vooral mononucleaire en daarnaast ook polymorphonucleaire leukocyten zien (vgl. Noriega *et al.*, 1974).

Wanneer op grond van de klinische gegevens, eventueel in combinatie met de resultaten van laboratoriumonderzoek, de diagnose vermoed wordt (Gerritsen en Knol, 1980), kan deze bevestigd worden door middel van de volgende onderzoeken.

1. Isolatie van M. pneumoniae

Het is mogelijk om *M. pneumoniae* op agar en in diphasisch medium (agar en bouillon) te kweken (Chanock *et al.*, 1962). Deze methode is zeer specifiek. Ook de gevoeligheid is groot, zoals blijkt uit de resultaten van Foy *et al.* (1966 ii). Deze auteurs vonden dat *M. pneumoniae* al aangetoond kon worden vóór het begin van de ziekte en vaak nog enige tijd na afloop van de ziekte aantoonbaar bleef, ook als de patiënt met antibiotica was behandeld.

Er zijn echter twee belangrijke bezwaren aan deze methode verbonden. Ten eerste duurt het lang voor de uitslag bekend is (5 dagen - 6 weken). Een tweede bezwaar is de relatief grote arbeidsintensiviteit, die enerzijds berust op de noodzaak steeds verse mediumcomponenten in voorraad te houden en anderzijds op de hoge eisen die gesteld moeten worden aan de kwaliteitscontrole. Dit is vooral moeilijk voor kleinere laboratoria met weinig positieve uitslagen (Smith, 1980).

Door verschillende auteurs worden andere media en methoden voor isolatie van *M. pneumoniae* beschreven, die sneller en in een groter percentage dan de bovengenoemde methode positieve resultaten zouden opleveren (Bredt *et al.*, 1975; Gabridge *et al.*, 1976; Tully *et al.*, 1979; Granato *et al.*, 1980). Deze methoden zijn nog

niet, of slechts op kleine schaal als routine-onderzoek toegepast. Dit laatste geldt ook voor de zeer gevoelige gecombineerde weefselkweektechniek die onlangs door Bayer *et al.* (1981) werd beschreven. Deze methode berust erop dat mycoplasma's, in tegenstelling tot zoogdiercellen, radio-actief gemerkt uracil in RNA incorporeren -waardoor men besmetting van weefselkweekcellen met mycoplasma kan aantonen-, waarna de op deze manier gevonden mycoplasma's met behulp van een immunofluorescentietechniek kunnen worden geïdentificeerd. Op deze wijze toonden zij *M. pneumoniae* aan in de "buffy-coat" en de liquor van een patiënt met het syndroom van Guillain-Barré bij een pneumonie door *M. pneumoniae*.

Serologische methoden

Deze worden het meest gebruikt voor de routine-diagnostiek van infecties met *M. pneumoniae*.

2. Reacties op koude agglutinenen

Koude agglutinenen veroorzaken agglutinatie van menselijke erythrocyten bij lage temperaturen. De agglutinenen zijn gericht tegen het I-antigeen, dat op erythrocyten van mensen, maar ook van veel dieren, voorkomt (Costea *et al.*, 1966). Verhoogde titers (>64) komen vanaf ongeveer een week na het begin van een pneumonie door *M. pneumoniae* voor (Chanock *et al.*, 1961); daarna kan de titer nog sterk stijgen.

Hoewel deze reactie niet specifiek is, is de combinatie van een positieve reactie met een voor *M. pneumoniae* typisch ziektebeeld toch vrijwel bewijzend voor de etiologie. Een nadeel is echter dat deze reactie slechts in 40-50% van de gevallen positief is.

3. Complementbindingsreactie (CBR) (Chanock *et al.*, 1962)

In het algemeen worden voor deze reactie twee soorten antigeen gebruikt; de lipide fractie van *M. pneumoniae* of een antigeen bereid van complete organismen. Een tenminste 4-voudige titerstijging in deze reactie is vrijwel bewijzend voor een acute infectie met *M. pneumoniae*. Sommige auteurs kennen ook betekenis toe aan een hoge titer in één monster serum, in combinatie met een bij *M. pneumoniae* passend ziektebeeld (Löwenberg, 1980). De CBR is speci-

fiek. Aan een mededeling dat er tussen *M. pneumoniae* en *Legionella pneumoniae* kruisreacties zouden voorkomen (Grady *et al.*, 1979), mag niet veel betekenis worden gehecht. De kruisreacties berustten vermoedelijk op het gebruik van een inferieur antigeen van *Legionella* (Taylor *et al.*, 1980). Dat kruisreacties tussen beide micro-organismen ontbreken, is van wezenlijk belang omdat de differentiaal diagnose tussen de ziekten door deze twee micro-organismen moeilijk is. Verder zij vermeld -waarop reeds eerder is gewezen- dat aspecifieke titerstijgingen bij pancreatitis zouden kunnen voorkomen (Leinikki *et al.*, 1973, 1976).

4. Immunofluorescentie (IF)

Immunofluorescentietechnieken speelden een belangrijke rol bij het ontdekken van de pathogene rol van *M. pneumoniae* (zie boven). Skaug *et al.* (1976) onderzochten met behulp van de indirecte IF-reactie het verloop van IgG- en IgM-antistoftiters bij infecties met *M. pneumoniae*. Zoals gebruikelijk in de serologie, werden 4-voudige titerstijgingen als een bewijs voor een acute infectie beschouwd. Wegens de bewerkelijkheid wordt deze reactie slechts op beperkte schaal toegepast.

5. Indirecte of passieve haemagglutinatie (IHA)

Deze reactie werd voor het eerst beschreven door Dowdle en Robinson (1964) en berust op haemagglutinatie van met *M. pneumoniae* gesensibiliseerde (kippe-)erythrocyten door antistoffen. Er is thans een eenvoudig uit te voeren, commerciële test beschikbaar (Taylor, 1979).

6. Groei- en stofwisselingsremming

Op basis van groeiremmingsreacties op agar ter typering van mycoplasmastammen, zoals die o.a. door Huysmans-Evers en Ruys (1956) en Herderschee *et al.* (1963) werden gebruikt, ontwikkelde Jensen (1964) een reactie voor de bepaling van antistoftiters, de tetrazoliumreductie remmingsreactie (TRI). *M. pneumoniae* wordt gekweekt in een vloeibaar medium (bouillon). Hierbij wordt tetrazolium toegevoegd, dat door *M. pneumoniae* wordt gereduceerd tot een gele kleurstof. Een variant hierop is de "metabolic inhibition test" (MIH). Hierbij wordt in plaats van tetrazolium glucose

toegevoegd. Dit wordt omgezet door *M. pneumoniae*, waarbij de pH verlaagd wordt. Dit kan worden aangetoond met een indicator (phenolrood) (Taylor-Robinson *et al.*, 1966). Indien men nu -tegelijk met *M. pneumoniae*- patiëntenserum (in verdunningen) aan het medium toevoegt, zal de groei en daarmee de stofwisseling van *M. pneumoniae* door eventueel aanwezige antilichamen worden geremd. Hierdoor wordt de kleuromslag verhinderd.

Deze reactie wordt beschouwd als zeer specifiek voor *M. pneumoniae*. Een nadeel is dat door behandeling van patiënten met antibiotica fout-positieve reacties kunnen optreden, doordat in het patiëntenserum aanwezige antibiotica de groei kunnen remmen (Smith en Herrmann, 1971). Als variant op deze test beschreven Brunner *et al.* (1972) een "mycoplasmacidal test" (MCT) die gevoeliger bleek te zijn dan de bovengenoemde reacties. Deze reactie berust op het principe dat *M. pneumoniae* door antistoffen (uit het te onderzoeken serum) en complement worden gedood, waarschijnlijk door lysis. Doordat het aantal overlevende mycoplasmata bij elke verdunning door middel van kweek moet worden vastgesteld, is deze reactie bewerkelijk.

7. Radio-immunoassay (RIA)

Door enkele onderzoekers (Brunner *et al.*, 1973 i, 1977 i, 1978; Price, 1980) zijn radio-immunoassays beschreven voor het aantonen van antistoffen tegen *M. pneumoniae*. Hiermee kunnen ook specifieke IgM-antistoffen worden aangetoond (Price, 1980). Deze methoden zijn gevoelig, maar vonden geen ingang in het routine-onderzoek.

8. Enzyme-linked immunoassay

Dit onderwerp wordt hieronder (in dit hoofdstuk) afzonderlijk beschreven. Deze reactie wordt nog vrijwel niet in de routine toegepast.

THERAPIE

Vele infecties met *M. pneumoniae* verlopen licht en met weinig symptomen. De ernstiger vormen, de *pneumoniën*, genezen in het al-

gemeen zonder antimicrobiële therapie of met uitsluitend symptomatische therapie spontaan. Op grond van de ernst van de ziekte of van hinderlijke klachten kan therapie toch wenselijk zijn. *Erythromycine* en *tetracycline* hebben hun effectiviteit bewezen (Shames *et al.*, 1970). Zij bespoedigen het verdwijnen van de klinische symptomen en röntgenologische afwijkingen. Het verdient aanbeveling de therapie gedurende tenminste 2 weken te geven. Ook voor patiënten met *bulleuze myringitis* wordt therapie geadviseerd (Couch, 1980). Routine-onderzoek naar resistentie tegen antibiotica wordt zelden verricht. Resistentie tegen oxytetracycline (gepaard gaande met gevoeligheid voor doxycycline) en resistentie tegen erythromycine zijn echter beschreven (Niitu *et al.*, 1970; Taylor-Robinson *et al.*, 1980).

PREVENTIE

Een goede preventie van infectie door *M. pneumoniae* bestaat er niet. Antimicrobiële therapie vermindert de overdracht van ziekte niet (Foy en Alexander, 1969). Wel bleek uit een onderzoek van Jensen *et al.* (1967) dat door prophylactisch gebruik van oxytetracycline gedurende 10 dagen door familieleden van een zieke niet het aantal infecties maar wel de morbiditeit bij hen verminderde. Een dergelijk onderzoek is echter nooit herhaald.

Vaccinatie met geïnactiveerde vaccins gaf ongeveer 50% protectie tegen pneumonie in verschillende onderzoeken (Smith *et al.*, 1967; Mogabgab, 1968; Wenzel *et al.*, 1977). Smith *et al.* (1967) zagen daarbij dat -na infectie met *M. pneumoniae*- ernstige ziektebeelden ontstonden bij die gevaccineerden, die geen duidelijke serologische respons in de TRI-reactie hadden getoond. Dit werd echter niet bevestigd door de andere onderzoekers. De beschermende waarde van deze vaccins lijkt dus beperkt, mede doordat immuniteit tegen *M. pneumoniae*, zelfs na een pneumonie, relatief kort duurt (Foy *et al.*, 1977).

Verder is onderzoek gedaan naar het effect van levende, verzwakte vaccins (Couch *et al.*, 1964; Greenberg *et al.*, 1974). Hoewel ze potentieel wel bruikbaar zijn, werd geen van deze vaccins ontwikkeld tot een algemeen aanvaard vaccin. De aanwijzingen, dat

sommige van de extrapulmonale ziekteverschijnselen veroorzaakt worden door immunologische reacties hebben de interesse voor het ontwikkelen van vaccins sterk doen verminderen (Clyde, 1979; Couch, 1980).

EPIDEMIOLOGIE

M. pneumoniae-infecties komen over de hele wereld voor. Het best gedocumenteerd is deze ziekte in de gematigde klimaten. De infecties komen het gehele jaar voor, met een grotere frequentie in het *koude seizoen* (Lind, 1971; Fernald *et al.*, 1975). In de meeste landen, waar dit onderzocht is, ziet men periodieke epidemische verheffingen met een tussenpoos van 4-6 jaar (Lind, 1971; Lind en Bentson, 1976; Noah en Urquhart, 1980). De laatste epidemie in Nederland was in 1978. In het algemeen tonen de epidemieën een geleidelijk begin en een langzame afnemings met een totale duur van ongeveer 2 jaar. Het is opvallend dat epidemieën in Europa ongeveer synchroon verlopen (Noah en Urquhart, 1980).

Het aandeel van pneumonieën door M. pneumoniae in de totale frequentie van pneumonieën is daarnaast afhankelijk van de onderzochte populatie, en daarbinnen vooral van de leeftijd.

Verdeling over leeftijd en geslacht

De hoogste relatieve frequentie van ziekte door M. pneumoniae wordt gevonden bij schoolkinderen en jonge volwassenen (o.a. Foy *et al.*, 1966 ii; Hers en Masurel, 1967). Uit familie-onderzoek blijkt echter dat de frequentie van infecties bij jonge kinderen tenminste even groot is als die bij volwassenen (Foy *et al.*, 1966 ii; Balassanian en Robbins, 1967). Ook sero-epidemiologisch onderzoek wees op een grote frequentie van infecties bij jonge kinderen (Taylor-Robinson *et al.*, 1966). Hieraan werd weinig betekenis gehecht. Brunner *et al.* (1972, 1973 i) die gevoelige en specifieke methoden om antistoffen tegen M. pneumoniae aan te tonen hadden ontwikkeld (RIA en MCT; zie boven), vonden een hoge frequentie van antilichamen bij zuigelingen en peuters, oplopend tot 83% bij 3-jarigen (!) (Brunner *et al.*, 1977 i, ii). Er bestond echter twijfel over de betekenis van deze antilichamen, omdat gly-

colipiden van plantaardige oorsprong -wortels en peentjes ("parsnips")- de radio-immunoprecipitatietest konden blokkeren (zie ook antigene structuur).

Brunner *et al.* (1977 i) vermeldden ook het resultaat van een niet-gepubliceerd dwarsdoorsnede-onderzoek van Canchola *et al.* in Washington D.C. en omgeving. Bij 3% van 1149 kinderen onder 5 jaar, zonder aandoeningen van de luchtwegen, werd *M. pneumoniae* gekweekt, bij 3,1% van in hetzelfde onderzoek onderzochte kinderen met respiratoire aandoeningen. Bij longitudinaal onderzoek bleek het organisme 2-3 weken aantoonbaar te zijn.

Fernald *et al.* (1975) toonden in een, goed opgezette, prospectieve studie in een "research day care centre" aan, dat infecties bij kinderen van 2 maanden tot 8 jaar frequent voorkwamen. Zij onderzochten tijdens een 6 jaar durend onderzoek 81 kinderen (230 kinder"jaren"). Zij vonden in 27 gevallen serologisch of door isolatie (14 maal) bevestigde infecties. Bij 5 van de kinderen werd tweemaal een infectie vastgesteld. In 4 gevallen waren er tekenen van een bovenste luchtweginfectie, éénmaal van bronchitis en éénmaal van pneumonitis. Slechts in één geval, bij een kind van 7 maanden, waren er röntgenologische afwijkingen van de longen; het voornaamste symptoom was "respiratory wheezing" gedurende 4 weken. De overige 20 gevallen waren vrij van symptomen. Het enige bezwaar van hun onderzoek is de relatieve ongevoeligheid van de door hen gehanteerde serologische methoden (CBR, MIH).

Er zijn dus sterke aanwijzingen dat de infectie frequent voorkomt op jonge leeftijd. Deze infecties verlopen meestal zonder of met geringe symptomen. Hoewel Fernald *et al.* (1975) en Canchola *et al.* (in Brunner *et al.*, 1977 i) vonden dat kinderen slechts korte tijd dragers van *M. pneumoniae* waren, zagen Foy *et al.* (1966 ii) bij jonge kinderen in gezinnen, waarin een geval van *M. pneumoniae* voorkwam, langdurig (3-4 maanden) kolonisatie, die overigens met weinig symptomen gepaard ging. Verschillende studies wijzen er op dat ziekte door *M. pneumoniae* vaker bij *jongens* dan bij *meisjes* voorkomt (o.a. Foy *et al.*, 1966 ii). Verder blijken infecties van de onderste luchtwegen en van ooraandoeningen vaker voor te komen bij kinderen die *tonsillectomie* hebben ondergaan (Foy *et al.*, 1966 ii).

Het gebruikelijke patroon van overdracht van ziekte door *M. pneumoniae* is dat eerst schoolkinderen worden besmet, vooral door contact met speelkameraadjes (Foy *et al.*, 1970). Daarna verspreidt de ziekte zich in het gezin. Uit een onderzoek van Foy *et al.*

(1966 ii) bleek dat het interval tussen ziektegevallen binnen het gezin varieerde van 16-25 dagen, gemiddeld 23 dagen; 64-71% van de kinderen en 17-53% van de volwassenen werden geïnfecteerd. Buiten de gezinnen was verspreiding zeldzaam.

Dit onderzoek en andere gegevens, zoals de hoge frequentie van *M. pneumoniae*-aandoeningen bij recruten (van der Veen en van Nunen, 1963; Hers *et al.*, 1969; Steinberg *et al.*, 1969) doen vermoeden dat intensief contact voor het ontstaan van infecties noodzakelijk is (Denny *et al.*, 1971).

De eerder genoemde waarnemingen dat infecties bij kinderen (meestal zonder of met weinig symptomen) frequent voorkomen, wijzen juist op een grote besmettelijkheid van de infectie. Een andere aanwijzing hiervoor is het min of meer synchrone verloop van de epidemieën in Europa. Experimenteel werd bij vrijwilligers vastgesteld dat -bij toediening als aerosol- 1 kolonievormende eenheid (CFU) van *Mycoplasma* al voldoende was voor het ontstaan van een infectie. Ook dit gegeven, in combinatie met het feit dat *M. pneumoniae* in aerosols bij verschillende vochtigheidsgraden verscheidene uren kan overleven (Wright *et al.*, 1968), zou een grote besmettelijkheid van geïnfecteerden doen verwachten.

Waarschijnlijk berusten deze ogenschijnlijk tegenstrijdige bevindingen op het effect van de dosis van de smetstof. Voor het ontstaan van ziekte, in het bijzonder van pneumonie, is, zo mag men aannemen, een grote dosis nodig die alleen bij intensief contact wordt overgedragen, terwijl voor het ontstaan van infecties (met geen of weinig ziekteverschijnselen) slechts een kleine dosis en een vluchtig contact nodig zijn. Proeven bij hamsters (Fernald en Clyde, 1970) ondersteunen deze veronderstelling. Het bleek dat de dosis van *M. pneumoniae* om pneumonie te veroorzaken 10 tot 100 maal hoger was dan die voor het ontstaan van infectie.

Bij infecties met *M. pneumoniae* spelen immunologische verschijnselen een belangrijke rol. Enerzijds is herstel van een pneumonie vermoedelijk mede afhankelijk van de aanwezigheid van IgA-, IgM- en IgG-antilichamen in het slijmvlies en het lumen van de luchtwegen (Biberfeld en Sterner, 1971; Brunner *et al.*, 1973 ii; Powell en Clyde, 1975). Anderzijds lijkt "sensibilisering" door een voorafgaande infectie noodzakelijk te zijn voor het ontstaan van pneumonie bij een volgende infectie (Fernald *et al.*, 1975; Brunner *et al.*, 1977 ii). Tenslotte gaat pneumonie vaak gepaard met vorming van auto-antilichamen, zoals koude agglutinenen, en zijn er aanwijzingen dat de ziekteverschijnselen elders in het lichaam mogelijk op deze auto-antilichamen berusten. Hieronder worden enkele van de belangrijkste immunologische verschijnselen uitvoeriger besproken.

Ontwikkeling van ontstekingsverschijnselen bij proefdieren

Na intranasale besmetting van hamsters met *M. pneumoniae* werd na enkele dagen peribronchiaal proliferatie met lymfoïde cellen waargenomen, eerst van IgM-plasmacellen, vervolgens van IgG- en IgA-cellen. Verder zag men een ophoping van lymfoïde cellen zonder immunoglobulinen in de lamina propria rond kleine bloedvaten. Deze infiltraten leken histologisch op die welke bij cutane "delayed hypersensitivity" worden gezien (Fernald, 1972; Fernald, 1979). Bij geïnfecteerde caviae, zelden bij geïnfecteerde hamsters, werd bovendien lymfekliervergroting gezien.

Nadat aanvankelijk het aantal polymorphonucleaire leukocyten (PMN) en mononucleaire leukocyten (MN) in het lumen van bronchi en bronchioli verlaagd was, zag men geleidelijk meer PMN verschijnen. Na 1½-2 weken was het aantal cellen (zowel PMN als MN) in het lumen sterk verhoogd. Dit viel ongeveer samen met het begin van serologisch aantoonbare antistofvorming. Een opvallend verschijnsel was het voorkomen van rosetten van PMN rond afgestoten epitheelcellen in het exsudaat. Deze verschenen rond de 9e dag, kort voor de intensivering van het exsudaat, en bleven 2 weken aantoonbaar (Clyde, 1971). Zij worden ook bij patiënten gevonden (Collier en Clyde, 1974). Vervolgens trad geleidelijk een vermin-

dering van exsudaat en infiltraat op. Na ongeveer 6 weken was genezing tot stand gekomen.

Antilichamen

Tijdens pneumonieën door *M. pneumoniae* worden specifieke antilichamen gevormd. Dit is in overeenstemming met het verschijnen van plasmacellen bij de hierboven beschreven experimentele infecties. IgM-antilichamen zijn vaak al in de eerste week na het begin van de ziekte aan te tonen (Skaug *et al.*, 1976; 11 van 15 sera). In tegenstelling tot wat bij vele andere infectieziekten gezien wordt, zijn antilichamen van deze klasse vaak nog na lange tijd aantoonbaar: een half jaar (Skaug *et al.*, 1976), soms meer dan 4 jaar (Biberfeld, 1971 i). De titer van IgG-antistoffen stijgt bijna gelijktijdig met die van IgM-antistoffen. Naarmate de infectie langer duurt, neemt het aandeel van IgG-antilichamen in de specifieke antilichamenproduktie ten opzichte van IgM-antilichamen toe. Bij ouderen overweegt de IgG-respons (Biberfeld, 1968). In het sputum van patiënten zijn IgM-, IgG- en IgA-antilichamen aantoonbaar (Biberfeld en Sterner, 1971). Ook in het neussceet van "vrijwilligers" die 1-2 weken tevoren intranasaal met *M. pneumoniae* waren besmet, zijn antilichamen aantoonbaar en wel vooral van de IgA klasse (Brunner, 1973 ii). De betekenis van de antilichamen voor het verloop van het ziekteproces is nog niet duidelijk. In het luchtwegsceet aanwezige IgM-antilichamen zouden, evenals bij bacteriën, aanhechting van mycoplasma aan cellen kunnen voorkomen (Williams en Gibbons, 1972); hiervoor is echter geen experimenteel bewijs geleverd. Wel bleek de spiegel van IgA-antilichamen in het luchtwegsceet van vrijwilligers die met geïnactiveerd *M. pneumoniae* waren gevaccineerd, goed gecorreleerd te zijn met de mate van protectie tegen manifeste pneumonie (Brunner *et al.*, 1973 iii). Dat antilichamen een effect kunnen uitoefenen op *M. pneumoniae*, is bekend uit *in vitro*-proeven. Zo kunnen IgG- en IgM-antilichamen, samen met complement, lysis veroorzaken. Van dit principe wordt gebruik gemaakt in de TRI, MIH en Mycoplasmacidal reactie (Brunner *et al.*, 1972). Ook spelen deze antilichamen een rol als opsoninen bij de fagocytose (zie onder).

Anderzijds is het mogelijk dat antilichamen betrokken zijn bij de bovengenoemde "sensibilisering" (Fernald *et al.*, 1975;

Brunner *et al.*, 1977 i). Fernald (1979) meent dat de oorzaak van "sensibilisering" in het cellulair-immunologische systeem moet worden gezocht. Het feit dat patiënten met hypogammaglobulinemie bij een infectie met *M. pneumoniae* geen duidelijke pneumonie krijgen (zie boven), vormt echter een aanwijzing dat antilichamen bij deze "sensibilisering" een rol spelen.

Als dit zo is, blijft de vraag hoe het mechanisme van deze "sensibilisering" dan zou zijn. Het is denkbaar dat circulerende immuuncomplexen hierbij een rol spelen. Biberfeld en Norberg (1974) onderzochten 39 patiënten met luchtweginfecties door *M. pneumoniae*, van wie er 34 pneumonie hadden. Met behulp van een plaatjesaggregatieproef vonden ze in 14 gevallen aanwijzingen voor het bestaan van circulerende immuuncomplexen. De complexen werden aangetoond op een tijdstip waarop de titers van complement-bindende antilichamen en koude agglutinenen nog laag waren. De 14 patiënten hadden echter geen complicaties die typisch zijn voor immuuncomplex-ziekten. Ook was er geen aantoonbaar verschil in ernst van de ziekte tussen patiënten met en zonder immuuncomplexen. De auteurs sluiten de mogelijkheid van een lokaal effect echter niet uit, temeer daar de immuuncomplexen werden aangetoond op een tijdstip waarop de klinische verschijnselen het meest uitgesproken waren.

Phagocytose

Bij de phagocytose van *M. pneumoniae* zijn zowel PMN als MN betrokken. Onder de laatste zijn veel macrophagen. Zoals hierboven reeds vermeld is, is het aantal PMN en MN in het bronchiaal sereet van geïnfecteerde proefdieren aanvankelijk verminderd, om tijdens het hoogtepunt van de peribronchiale infiltraten sterk in aantal toe te nemen (Clyde, 1971). Macrophagen bezitten zonder aanwezigheid van antilichamen geen of slechts geringe phagocytair activiteit ten opzichte van *M. pneumoniae*, zelfs al vindt wel hechting van *Mycoplasma* aan deze cellen plaats (Powell en Clyde, 1975). Pas na toevoeging van antilichamen, eventueel in combinatie met complement, treedt phagocytose op. Eenmaal gefagocyteerd worden de *Mycoplasma* gedood (Erb en Bredt, 1979).

PMN zijn -behalve bij de phagocytose- ook betrokken bij de vorming van rosetten rond afgestoten epitheelcellen, die -zoals

hierboven reeds is vermeld- bij geïnfecteerde proefdieren en patiënten kunnen ontstaan. Deze kunnen ook *in vitro* worden gevormd wanneer epitheelcellen, *M. pneumoniae*, anti-mycoplasma antilichamen, complement en PMN worden samengebracht (Clyde, 1971; Collier en Clyde, 1974).

Op grond van deze gegevens lijkt het waarschijnlijk dat fagocytose een belangrijk onderdeel van het genezingsproces is, maar pas effectief wordt in aanwezigheid van antilichamen.

Lymphocyten

Het is nog niet mogelijk om een samenhangend beeld te geven van de rol van cellulaire immuniteit bij infecties met *M. pneumoniae*, omdat hierover slechts betrekkelijk weinig bekend is (Fernald, 1979). De volgende waarnemingen lijken echter van belang.

Er zijn circulerende lymphocyten aantoonbaar, die reageren op antigeen. Deze zijn al vroeg tijdens de ziekte en nog langere tijd erna aantoonbaar (Fernald, 1972) en moeten waarschijnlijk tot de "T-memory cells" worden gerekend. Bij proefdieren (hamsters) met T-lymphocytendeficiëntie, die met *M. pneumoniae* of met *M. pulmonis* -een bij knaagdieren (ratten) voorkomende mycoplasma- waren geïnfecteerd, bleken minder grote infiltraten en lagere antilichaamtiters gevonden te worden (Taylor *et al.*, 1974). Bij infecties met *M. pulmonis* -maar niet met *M. pneumoniae*- werd onder deze omstandigheden verspreiding van de infectie naar andere organen gevonden (Denny *et al.*, 1972). Dit laatste zou wijzen op een rol voor de T-lymphocyten om invasie van de weefsels te voorkomen. Hoewel ook voor *M. pneumoniae* naar de rol van een eventuele "cell-mediated immune" respons, speciaal als bescherming tegen een dergelijke invasie, gezocht is, zijn hiervoor geen directe aanwijzingen gevonden (Fernald, 1979).

Tenslotte zij nog vermeld dat *M. pneumoniae* een remmend effect heeft op "delayed hypersensitivity", zoals Biberfeld en Sterner (1976 i, ii) bij patiënten, aan de hand van een verlaagde frequentie van positieve huidreacties op tuberculine, aantoonden.

Auto-antilichamen

Tijdens infecties met *M. pneumoniae* worden antilichamen te-

gen antigene componenten van eigen weefsel gevormd. De meest op de voorgrond tredende antilichamen, de zogenaamde koude agglutinen, worden hieronder afzonderlijk behandeld. Andere auto-antilichamen zijn die tegen *lymphocyten*. Deze lijken hoofdzakelijk tegen het I-antigeen gericht te zijn en dus identiek te zijn aan de koude agglutinen (Biberfeld *et al.*, 1976).

Zowel bij patiënten met als bij patiënten zonder neurologische complicaties werden antilichamen tegen *hersenweefsel* gevonden. Vele van deze patiënten hadden ook antilichamen tegen *long-* en *leverweefsel*, zij het in lagere titers. De antilichamen konden worden geabsorbeerd door toevoeging van *M. pneumoniae*-antigeen. Zij behoorden uitsluitend tot de IgM-klasse (Biberfeld, 1971 ii). Ditzelfde gold voor antilichamen tegen glad spierweefsel, die bij patiënten met *M. pneumoniae*-infectie werden gevonden (Biberfeld en Sterner, 1976 i).

Een goede verklaring voor het ontstaan van auto-antilichamen is nog niet gegeven. De volgende veronderstellingen zijn geopperd. Er zouden natuurlijke kruisantigenen met weefselantigenen kunnen voorkomen op *M. pneumoniae* (o.a. Costea *et al.*, 1972). *M. pneumoniae* zou B-lymphocyten rechtstreeks polyclonaal kunnen activeren (Biberfeld en Gronowicz, 1976), zoals bekend is van sommige andere antigenen (bv. lipopolysacchariden en Epstein-Barr virus) (Vaughan, 1979). De waarneming dat *M. pneumoniae* *in vitro* antigenen uit zijn milieu kan opnemen (Sethi en Brandis, 1972) en de bevinding dat auto-antilichamen door extracten van *M. pneumoniae* kunnen worden geabsorbeerd (Biberfeld, 1971 i; Costea *et al.*, 1972), pleiten voor het ontstaan van complexen van *M. pneumoniae* met gastheerantigenen, die immunogeen zijn. Hierbij zou mycoplasma (of delen ervan) de antigenen zodanig kunnen presenteren aan B-cellen, dat deze rechtstreeks zonder tussenkomst van T-cellen worden gestimuleerd. Een aanwijzing voor dit laatste vormt het gegeven dat de auto-antilichamen uitsluitend tot de IgM-klasse behoren, hetgeen past bij zogenaamde "thymus-independent antigens" (Lachman, 1978).

Koude agglutinen

Koude agglutinen zijn antilichamen tegen antigenen op menselijke erythrocyten die bij lage temperatuur (4°C, soms ook nog

bij 22°C) de erythrocyten doen agglutineren. De koude agglutinenen die bij *M. pneumoniae*-infecties worden aangetroffen, zijn tegen het I-antigeen gericht. Ze komen bij de meeste volwassenen in lage titers voor. De antilichamen behoren tot de IgM-klasse. Bij patiënten met pneumonie door *M. pneumoniae* komen hoge titers voor. De antilichamen blijken in deze gevallen van polyclonale oorsprong te zijn (o.a. Goldstone, 1979). Het I-antigeen is aanwezig op rode bloedcellen van vrijwel alle volwassenen. Bij zuigelingen vindt men daarentegen voornamelijk het i-antigeen. Ook bij vele diersoorten komt het I-antigeen voor; antistoffen ertegen zou men dus kunnen beschouwen als heterophile antistoffen. Het I-antigeen kan worden gezien als de kern van verschillende bloedgroep-antigenen. De antigenen van het ABO-systeem (H, A en B) en van het Lewis-systeem bestaan uit het I-antigeen met daaraan gekoppeld verschillende verbindingen, voornamelijk oligosacchariden (Mollison, 1979). Door afsplitsing van deze oligosacchariden is het mogelijk het I-antigeen te isoleren (Feizi *et al.*, 1971).

Er zijn verschillende hypothesen geopperd ter verklaring van de hoge frequentie en hoge titer van koude agglutinenen bij infecties met *M. pneumoniae*. Sommige onderzoekers menen dat het I-antigeen door *M. pneumoniae* wordt veranderd (Schmidt *et al.*, 1965; Smith *et al.*, 1967; Barile, 1979). Zo vonden Smith *et al.* (1967) dat bij patiënten met een primaire atypische pneumonie met een verhoogde titer van koude agglutinenen de I-reactiviteit van de erythrocyten verminderd is. De aanwezigheid van tegen het I-antigeen gerichte antilichamen zou dit verschijnsel ook kunnen veroorzaken, maar een rechtstreeks effect van *M. pneumoniae* lijkt waarschijnlijker. Prae-incubatie van erythrocyten met *M. pneumoniae in vitro* blijkt namelijk de I-activiteit te verminderen (Schmidt *et al.*, 1965). Deze bevindingen zouden kunnen wijzen op een afsplitsing of in ieder geval verandering van het I-antigeen door *M. pneumoniae*. Het veranderde I-antigeen zou zich dan als een lichaamsvreemd antigeen gedragen en de produktie van anti-I-agglutinenen stimuleren (Barile, 1979).

Een andere veronderstelling is dat *M. pneumoniae* of delen van *M. pneumoniae* zich met het I-antigeen "associëren" ten gevolge waarvan het I-antigeen door het lichaam als antigeen herkend wordt en waardoor hiertegen vervolgens antilichamen worden gevormd.

Voor deze veronderstelling pleit dat menselijke erythrocyten die voorbehandeld zijn met *M. pneumoniae*, wel koude agglutinenen bij proefdieren (konijnen) kunnen opwekken, terwijl dit niet gebeurt als beide componenten apart worden toegediend (Feizi *et al.*, 1969).

Volgens Costea *et al.* (1971, 1972) is het ook mogelijk dat de vorming van koude agglutinenen op kruisreacties tussen *M. pneumoniae* en I-antigeen berust. Zo konden Costea *et al.* (1971) koude agglutinenen opwekken door hoge doses dode of levende *M. pneumoniae* bij konijnen in te spuiten. Verder konden koude agglutinenen worden geabsorbeerd met behulp van een polysaccharide extract van *M. pneumoniae* (Costea *et al.*, 1972). In vroegere studies (Biberfeld, 1968; Feizi *et al.*, 1969) was het niet gelukt met behulp van *M. pneumoniae* koude agglutinenen te absorberen, maar men had toen gebruik gemaakt van glycolipide extracten.

Tenslotte zouden de koude agglutinenen gevormd kunnen worden door rechtstreekse polyclonale activering van de B-cellen door *M. pneumoniae* (Biberfeld en Gronowicz, 1976; zie boven). Hiertegen pleit dat tijdens infecties met *M. pneumoniae* de vorming van koude agglutinenen sterker op de voorgrond staat dan die van andere auto-antilichamen.

De eerste twee hypothesen gaan voorbij aan het feit dat er geen duidelijke aanwijzingen zijn, dat erythrocyten tijdens het begin van de infectie in noemenswaardige aantallen in contact komen met *M. pneumoniae*, terwijl koude agglutinenen vrij snel worden gevormd. Het is echter ook denkbaar dat het contact met het I-antigeen niet via de erythrocyten tot stand komt, maar op andere wijze. Er zijn aanwijzingen dat het I-antigeen -als onderdeel van de bloedgroep-antigenen- vrijwel overal in het lichaam voorkomt bv. in plasma in de vorm van Lewis-antigeen, ook al konden Feizi en Monger (1967) het niet in longen aantonen.

PATHOGENESE

Ondanks de vele onderzoeken is de pathogenese van infecties en pneumonien door *M. pneumoniae* nog niet duidelijk. De schaarse pathologisch-anatomische gegevens en de resultaten van

in vitro-onderzoek en dierproeven geven wel een aantal uitgangspunten.

M. pneumoniae is dank zij zijn bewegelijkheid in staat door te dringen door de slijm laag van de luchtwegen en zich met de "tip" te hechten aan het oppervlakkige membraan van trilhaarcellen. Het ligt daarbij tussen de ciliën, maar blijft extracellulair. Vervolgens treden veranderingen in de trilhaarbewegingen op, die worden gevolgd door histopathologische veranderingen en tenslotte leiden tot exfoliatie van de cel (Collier en Clyde, 1971). Hoe deze cytotoxische effecten ontstaan, is nog onzeker; mogelijk speelt peroxide, dat door *M. pneumoniae* wordt gevormd, hierbij een rol (Cohen en Somerson, 1967; Archer, 1979).

Hoewel deze gegevens, die berusten op onderzoek van geïnfecteerde orgaancultures, o.a. van menselijke foetale trachea, belangrijk zijn, is in de *in vitro*-experimenten de mogelijke rol van immunologische reacties buiten beschouwing gebleven. De al eerder beschreven experimenten met hamsters (Clyde, 1971) en de bevindingen bij patiënten wijzen er echter op, dat immunologische verschijnselen, in het bijzonder voorafgaande "sensibilisering", een belangrijke component zijn bij het ontstaan van ziekte door *M. pneumoniae*. Het lijkt onwaarschijnlijk dat "delayed hypersensitivity" hierbij een belangrijke rol speelt. Evenmin zijn er duidelijke aanwijzingen voor een ander type allergie (Clyde, 1979; Fernald, 1979).

Voor het ontstaan van ziekteverschijnselen buiten de luchtwegen zijn misschien auto-antilichamen en immuuncomplexen van betekenis. Op de ontwikkeling van immuuncomplexen bij *M. pneumoniae*-infecties is hierboven reeds gewezen. Het lijkt onwaarschijnlijk dat afwijkingen elders in het lichaam rechtstreeks door *M. pneumoniae* worden veroorzaakt, omdat het infectieproces zich slechts bij uitzondering buiten de longen uitbreidt en dan nog alleen bij zeer ernstige infecties (zie: Letale Infecties) en bij immunodeficiëntie (Taylor-Robinson *et al.*, 1980).

Een goed model voor de pathogenese van *M. pneumoniae*-infecties, dat rekening houdt met alle bekende experimentele, klinische, immunologische, pathologisch-anatomische en epidemiologische bevindingen, is nog niet gegeven (Clyde, 1979; Archer, 1979; Coach, 1980).

Enzyme immuno-assays (EIA) werden voor het eerst in 1971 door Engvall en Perlmann en van Weemen en Schuurs, onafhankelijk van elkaar, beschreven.

Het principe is vergelijkbaar met dat van immunofluorescentie (IF) en radio-immuno-assays (RIA). Het te onderzoeken antigeen wordt aangetoond door middel van specifieke antilichamen, waaraan een "label" gekoppeld is (de zogenaamde conjugaten). Dit "label" is bij IF een fluorescerende stof, bij RIA een radio-actieve stof en bij EIA een enzym, bv. peroxidase. Dit enzym is niet rechtstreeks aan te tonen, maar is in staat een geschikt substraat in een kleurstof om te zetten. De hoeveelheid kleurstof die ontstaat, is een maat voor de hoeveelheid antigeen. De hoeveelheid kan kwalitatief, met het blote oog, of kwantitatief, door meting van de extinctie in een spectrophotometer, worden bepaald.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is een variant op de EIA, waarbij de reactie tussen antigeen en antilichaam zich afspeelt op de wand van buisjes of kommetjes van microtiterplaatjes. Hiertoe laat men antistoffen tegen het antigeen aan de wand adsorberen, waardoor vervolgens het aan te tonen antigeen gebonden wordt. Het op deze wijze aan de wand gebonden antigeen kan dan -zoals hierboven beschreven- met behulp van met enzym geconjugeerde antilichamen aangetoond worden. Er bestaan een aantal varianten op dit principe. Een uitgebreid overzicht is o.a. door Voller *et al.* (1978) gegeven, een korte samenvatting in de Nederlandse literatuur door van Loon en van der Veen (1979).

In veel gevallen wil men in plaats van antigeen antilichamen aantonen, zoals in de door ons gebruikte ELISA voor het aantonen van antilichamen tegen *M. pneumoniae*. Eén van de mogelijkheden om dit te doen is die, waarbij eerst antigeen aan de wand geadsorbeerd wordt. Voegt men vervolgens hieraan het te onderzoeken serum toe, dan zullen eventueel aanwezige specifieke antilichamen door het antigeen worden gebonden. Met (voor anti-IgG of anti-IgM antilichamen specifieke) conjugaten kan men de gebonden antilichamen aantonen (indirecte "sandwich"-ELISA voor antistoffen, Voller, 1978).

De procedure is nu als volgt. Eerst wordt het antigeen (*M.*

pneumoniae) geadsorbeerd aan de wand van kommetjes van microtiterplaatjes. Na verwijderen van het overtollige antigeen wordt het te onderzoeken serum (in verdunningen) in de kommetjes gebracht. De specifieke antistoffen tegen *M. pneumoniae* worden nu aan het antigeen gebonden. Nadat de niet-gehechte bestanddelen van het serum door wassen met spoelvloeistof zijn verwijderd, wordt vervolgens een bij dieren bereid en met peroxydase gelabeld antiserum tegen humane immunoglobulinen (anti-immunoglobulinen) toegevoegd. De anti-immunoglobulinen worden aan de achtergebleven, aan het *M. pneumoniae*-antigeen gehechte antilichamen gebonden. Na verwijdering van de overtollige anti-immunoglobulinen wordt het substraat, in ons geval ortho-phenylenediamine (OPD), toegevoegd. Door het peroxydase wordt dit omgezet tot een geel-oranje kleurstof. De extinctie hiervan wordt gemeten met een spectrophotometer. De extinctie is evenredig met de hoeveelheid kleurstof en deze is weer een maat voor de hoeveelheid gebonden enzym, en -uiteindelijk- voor de hoeveelheid antilichamen tegen *M. pneumoniae* in het onderzochte serum. Het verband tussen extinctie en antilichamen is echter niet rechtlijnig, of anderszins eenvoudig te omschrijven. Dit brengt met zich mee dat er verschillende manieren bestaan om de in ELISA gevonden extincties in, voor de praktijk bruikbare, gegevens om te zetten. Een recent overzicht van deze problematiek werd gegeven door de Savigny en Voller (1980). Het is mogelijk een ELISA voor IgG- en IgM-antilichamen te ontwikkelen door gebruik te maken van anti-immunoglobulinen (conjugaten) die zodanig zijn bereid en gezuiverd, dat ze specifiek zijn voor één klasse antilichamen.

Bij de start van dit onderzoek was er nog geen ELISA voor *M. pneumoniae* beschreven, behoudens een ongedocumenteerde verwijzing in een overzichtsartikel (Voller *et al.*, 1978) betreffende de mogelijkheid van deze reactie. Wel was voor enkele mycoplasma-soorten van dieren een ELISA ontwikkeld, namelijk voor *M. suipneumoniae* (Bruggmann *et al.*, 1976, 1977) en voor *M. pulmonis* (Horowitz en Cassell, 1978).

In 1980 verschenen twee artikelen waarin een ELISA voor *M. pneumoniae* werd beschreven. Busolo *et al.* (1980) maakten gebruik van met formaline gefixeerd, ingevroren *M. pneumoniae*-antigeen en van antigeen dat verkregen werd door *M. pneumoniae* in microtiter-

plaatjes te kweken. Hoewel zij aannemelijk maken dat ELISA bruikbaar is voor het aantonen van specifieke IgG-, IgM- en IgA-antilichamen tegen *M. pneumoniae*, is hun artikel wat betreft standaardisatie van de reactie en vergelijking met bestaande methoden onvoldoende gedocumenteerd om praktisch bruikbaar te zijn.

Räisänen *et al.* (1980) gingen uit van een met Tween-ether behandeld, gezuiverd *M. pneumoniae*-antigeen. Dit antigeen is vrij van glycolipiden en blijkt weinig of geen kruisreacties te tonen met sera van patiënten met acute pancreatitis. Theoretisch zou men kunnen verwachten dat door het verwijderen van het belangrijkste antigeen, de glycolipiden, de specificiteit verhoogd zou kunnen zijn ten koste van de gevoeligheid. Dit laatste blijkt echter niet uit hun resultaten, hoewel de interpretatie hiervan bemoeilijkt wordt doordat de uitkomsten op een afwijkende manier zijn weergegeven. Vergelijking met andere reacties op *M. pneumoniae* en resultaten van vervolgonderzoek bij patiënten werden niet beschreven.

DOEL VAN HET ONDERZOEK

Doel van het onderzoek was om na te gaan of de diagnostiek van infecties met *M. pneumoniae* verbeterd en bespoedigd kon worden met behulp van een ELISA-techniek. Met het oog hierop werd een ELISA ontwikkeld voor het bepalen van specifieke IgG- en IgM-antilichamen tegen *M. pneumoniae* (Hoofdstuk 3). Hierbij werd veel aandacht besteed aan de relatie tussen extinctie en hoeveelheid antilichamen in de ELISA om zo te kunnen komen tot een goede en inzichtelijke, kwantitatieve weergave van de resultaten (Hoofdstuk 4 en 5). De mogelijke betekenis van de ELISA voor de diagnostiek werd onderzocht door onderzoek van sera van gezonden en patiënten en vergelijking van de nieuwe methode met een aantal bestaande onderzoeksmethoden, namelijk proeven om *M. pneumoniae* te kweken en verder de complementbindingsreactie, metabolic inhibition test en indirecte haemagglutinatiereactie (Hoofdstuk 6, 7 en 8).

Een tweede doel van het onderzoek was inzicht te verkrijgen in de frequentie van voorkomen van infecties met *M. pneumoniae*

onder de bevolking door middel van sero-epidemiologisch onderzoek met behulp van de ELISA-IgG (Hoofdstuk 9 en 10). De hiervoor gebruikte sera waren afkomstig van sera van patiënten, die waren ingestuurd voor onderzoek op toxoplasmose. Een deel van deze sera werd ook met behulp van de ELISA-IgM onderzocht. Het doel hiervan was voornamelijk om met de resultaten, evenals met die van het bevolkingsonderzoek met behulp van ELISA-IgG, normale waarden voor deze reacties vast te stellen (Hoofdstuk 9 en 10).

MATERIAAL EN METHODEN

2.1. KWEEKMEDIA

Voor het kweken van *M. pneumoniae* om antigeen te bereiden ten behoeve van de ELISA, CBR en MIH, voor de MIH, voor de ELISA (als toevoeging aan de verdunningsvloeistoffen) en voor kweekproeven met en transport van patiëntenmateriaal (keelsecreet) werden verschillende varianten van het kweekmedium volgens Chanock *et al.* (1962) gebruikt.

2.1.1. Vloeibare media2.1.1.0. *Basis*

"PPLO-bouillon":

PPLO-bouillon zonder kristalviolet (Difco 0554-02)	2,1 g
thalliumacetaat 2½% in aqua bidest.	2 ml
aqua bidest. ad	100 ml

Met deze basis werden de volgende drie vloeibare media bereid:

2.1.1.1. *Medium I*

PPLO-bouillon	70 ml
paardeserum (niet geïnactiveerd)	20 ml
vers gistextract (25%) in aqua bidest., pH 8,0 (bewaren bij -20°C)	10 ml
glucose 10% in aqua bidest.	10 ml
phenolrood 0,2% in NaOH 0,02N	2 ml
penicilline G 50.000 E/ml in aqua bidest.	2 ml
Zonodig pH stellen op 7,8.	

2.1.1.2. *Medium II*

PPLO-bouillon	80 ml
IgG-vrij paardeserum (Gibco 210-627)	5 ml
PPLO-serumfractie (Difco 0441-62)	2 ml
vers gistextract (25%) in aqua bidest.	10 ml

glucose 10% in aqua bidest.	10 ml
phenolrood 0,2% in NaOH 0,02N	2 ml
penicilline G 50.000 E/ml in aqua bidest.	2 ml
Zonodig pH stellen op 7,8.	

2.1.1.3. *Medium III*

Als medium II, maar zonder glucose en penicilline.

2.1.2. Agar

2.1.2.0. *Basis*

"PPLO-agar":

PPLO-agar (Difco 0412-01)	3,4 g
thalliumacetaat 2½% in aqua bidest.	2 ml
aqua bidest. ad	100 ml

Voor kweekproeven met patiëntenmateriaal werd hiermee bereid:

2.1.2.1. *Medium IV (agar)*

PPLO-agar, afgekoeld tot 44°C	70 g
paardeserum (niet geïnactiveerd)	20 ml
vers gistextract (25%) in aqua bidest., pH 8,0	10 ml
glucose 10% in aqua bidest.	10 ml
Zonodig pH stellen op 7,8.	

Bereiding van de agar vond plaats bij 44°C; het medium werd uitgegoten in Petrischalen met een doorsnede van 6 cm, 5 ml/plaatje.

2.1.2.2. *Medium V (diphasisch medium)*

In buizen werd 1 ml "PPLO-agar" (zonder paardeserum etc.) uitgegoten. Kort voor gebruik werd hieraan 2 ml medium I toegevoegd.

2.2. *ELISA IgG EN IgM (INDIRECT)*

2.2.1.1. *Antigeen*

De FH-stam (Liu, 1957) van *M. pneumoniae* werd geënt in Kimble-flessen met 20 ml kweekmedium II. Hierin vindt op de glas-

wand groei plaats (Somerson *et al.*, 1967). Zodra kleuromslag van het phenolrood optrad, werden de op de wand gegroeide kolonies geoogst door -na 3 maal wassen met PBS pH 7,2 met glucose- de achtergebleven kolonies af te schrapen en te verdunnen in 2 ml PBS pH 7,2. De eiwitconcentratie van de suspensie, bepaald volgens de methode van Lowry, bedroeg 100-180 µg/ml.

Vervolgens werd de suspensie van *M. pneumoniae* met ultrason behandeld (Branson Sonifier, driemaal 10 seconden, stand 20) en tenslotte gelyseerd volgens een modificatie van de methode die door Horowitz en Cassell (1978) is beschreven. Bij één deel antigeen werd één deel carbonaat-bicarbonaat buffer (0,1 M, pH 10,0) gevoegd. Na 10 min. incubatie bij 37°C werden twee delen boorzuoeroplossing (2,2%) toegevoegd; zonodig werd de pH op 7,2 gesteld. Het antigeen werd dus 1:4 verdund.

Voor gebruik in de ELISA werd het antigeen verder verdund tot 5-7,5 µg eiwit/ml, op geleide van een antigeentitratie (Hoofdstuk 3).

2.2.1.2. *Controle-antigeen*

Als controle-antigeen werd een stam van *M. pulmonis* gebruikt die in 1972 in het instituut voor medische microbiologie te Nijmegen uit de trachea van een rat was geïsoleerd (stam M 72-138). De stam werd op dezelfde wijze en in hetzelfde medium gekweekt als de FH-stam. Pas na een aantal passages bleek *M. pulmonis* zich voldoende aan de wand te hechten. Het bleek dat de opbrengst iets lager was dan die van *M. pneumoniae* (±75-150 µg/ml). De suspensie van *M. pulmonis* werd vervolgens op dezelfde manier behandeld als die van *M. pneumoniae* en ook gebruikt in een verdunning van 5-7,5 µg eiwit/ml.

2.2.1.3. *Orion-antigeen*

Een klein deel van de sera voor het sero-epidemiologisch onderzoek werd bovendien onderzocht met een commercieel antigeen van *M. pneumoniae* (antigeen voor enzyme immuno-assay, ORION D-869). Dit antigeen werd 1:24 verdund. De ELISA-procedure voor het Orion-antigeen was gelijk aan die voor het eigen antigeen.

2.2.2. Conjugaten

Voor ELISA-IgG werd anti-human IgG specific γ -chains Peroxidase conjugated (Dako P1090) gebruikt in verdunningen van 1:500 tot 1:1000. Voor ELISA-IgM werd anticorps anti-IgM (anti- μ) d'homme, marqué à la peroxydase (l'Institut Pasteur 75061) gebruikt in verdunningen van 1:750 tot 1:1500. Telkens als een nieuwe batch conjugaat in gebruik werd genomen, werd de optimale verdunning bepaald door middel van een bloktitratie van antigeen en conjugaat.

2.2.3. Substraat

Als substraat werd gebruikt:

OPD 1 °/oo (G/V)

H₂O₂ 1 °/oo (V/V)

in PBS pH 6,15.

2.2.4. Verdunningsmiddelen

Met uitzondering van dat voor het substraat, waren alle verdunningsmiddelen gebaseerd op PBS pH 7,2.

Dit werd als zodanig gebruikt als oplosmiddel voor het antigeen. Voor de overige procedures werd hieraan 0,05% Tween 20 toegevoegd (PBS/Tween). Voor de verdunning van de sera werd hieraan in de eerste proeven aanvankelijk foetaal kalverserum (FCS) 2% toegevoegd. Later werd kweekmedium III 40% toegevoegd. Voor de verdunning van de conjugaten werd aanvankelijk ook FCS (2%) toegevoegd, later kweekmedium III 10%.

2.2.5.1. Instrumenten

Bij het maken van verdunningen en het "inpietteren" in de microtiterplaatjes werd gebruik gemaakt van Gilson Pipetman 20, 200 en 1000 μ l micropipetten en van Finnpipette 50-200 μ l 8-kanaals- en 20-50 μ l 12-kanaalspipetten (Titertek).

2.2.5.2. Aflezen

De extincties werden gemeten bij 492 nm (bij zeer hoge extincties ook bij 450 nm) met behulp van een Multiskan (Titertek). Deze meet een extinctie door de bodem van de microtiterplaat en vergelijkt de gevonden waarde met een tevoren gemeten uitgangswaarde.

Als uitgangswaarde kan bv. een kolom kommetjes worden gebruikt, nadat hierin de gehele proef zonder serum uitgevoerd is. In onze opstelling werd echter in de regel de onbelemmerde stralengang als uitgangswaarde voor de meting in de Multiskan gebruikt. Vervolgens werden de gevonden waarden gecorrigeerd door de resultaten van controlekommetjes zonder serum te middelen (na aftrek van de twee hoogste waarden) en dit gemiddelde van alle gemeten extincties af te trekken.

2.2.5.3. Wassen

Tussen alle stappen van de ELISA-procedure behalve tussen de stap waarbij substraat werd toegevoegd, en die waarbij zwavelzuur werd toegevoegd (om de reactie te stoppen), werd vier keer gewassen met $\pm 250 \mu\text{l}$ PBS/Tween in de Dynateck dynawasher AM71.

2.2.6. Procedure

Deze was, op het gebruik van de conjugaten na, gelijk voor de ELISA-IgM en -IgG. Een hoeveelheid van $200 \mu\text{l}$ verdund antigeen, respectievelijk controle-antigeen, werd gebracht in de kommetjes van een vlakbodem microtiterplaatje (Greiner, art. no. 655161). De plaatjes werden gedurende 2 uur bij 37°C geïncubeerd. Na wassen werd $100 \mu\text{l}$ verdund serum (afhankelijk van de proef in 2- of 4-voudige verdunningsreeksen vanaf een verdunning van 1:25 of hoger; soms -in duplo- in één verdunning), in de kommetjes gebracht. In één of meer kolommen werd (als controle) géén serum, maar wel de verdunningsvloeistof gebracht. Daarna werd gedurende 2 uur bij 37°C geïncubeerd, in een aantal proeven gedurende een nacht bij 4°C . Na wassen werd $100 \mu\text{l}$ verdund conjugaat anti-IgG of anti-IgM ingebracht. Vervolgens werd gedurende 1 uur bij 37°C geïncubeerd. Na een laatste keer wassen werd $100 \mu\text{l}$ substraat in

ieder kommetje gebracht. De plaatjes werden daarna bij 22°C geplaatst, gedurende 10 à 20 min., afhankelijk van de kleurontwikkeling. De enzym-reactie werd gestopt met 200 µl 3N H₂SO₄.

2.2.7. Definiëring van de titers; ELISA-eenheden

Onder de titer van antilichamen in een serologische reactie wordt in het algemeen verstaan, het omgekeerde van die verdunning, waarin de betreffende reactie nog juist als positief wordt beschouwd.

In de ELISA is het punt, waarop de reactie nog juist positief is, niet scherp aan te geven, zeker niet bij gebruik van de spectrophotometer.

In ons onderzoek werd een titer berekend door te bepalen in welke verdunning een serum een nader aan te duiden extinctie (de grenswaarde) bereikte. Wij kozen als grenswaarde de extinctie van de negatieve controlesera (2.7.1.2. en 2.7.1.3.) bij een verdunning van 1:50. De verantwoording van deze keuze wordt gegeven in Hoofdstuk 5.1. en in Bijlage II.

De grenswaarde-extinctie werd niet rechtstreeks gemeten, maar volgens de in 2.2.8. beschreven methode uit de extincties bij alle in de betreffende proef onderzochte verdunningen van de negatieve controlesera berekend. Op overeenkomstige manier werd van de te onderzoeken sera de verdunning berekend met een extinctie gelijk aan de grenswaarde.

De titer van een serum in ELISA voor *M. pneumoniae* wordt nu als volgt gedefinieerd: de titer is het omgekeerde van de verdunning van het serum, waarbij -volgens berekening- de extinctie gelijk is aan de grenswaarde. De grenswaarde is de extinctie, die -volgens berekening- door het negatieve controleserum bereikt wordt bij een verdunning van 1:50.

Volgens bovenstaande definitie is de titer van de negatieve controlesera 50. Als de titer van een willekeurig positief serum of van een positief referentieserum door vooraf uitgevoerde titraties berekend is (bv. 600), dan kan men de grenswaarde ook met behulp van dit serum berekenen. De grenswaarde is dan de extinctie van het betreffende serum bij een verdunning die overeenkomt

met de titer ervan (in ons voorbeeld bij 1:600). Van deze mogelijkheid werd gebruik gemaakt in enkele proeven in Hoofdstuk 5, waarin de negatieve controlesera niet of niet in geschikte verdunningen waren onderzocht.

De keuze van de grenswaarde en dus van de hiermee berekende titers is enigszins arbitrair. Het leek wenselijk om de resultaten van ELISA weer te geven in een maat die minder afhankelijk was van de hoogte van de grenswaarde en meer direct inzicht gaf in de aard van het serum (negatief; zwak positief; positief). Om deze reden werd aan de negatieve controlesera een waarde van 1 ELISA-eenheid (E.U.) toegekend. De resultaten van de te onderzoeken sera werden eveneens uitgedrukt in E.U. Het aantal E.U. werd berekend door de titers van de betreffende sera te delen door de titer van de negatieve sera (dus door 50).

2.2.8. Rekenprogramma voor titerberekeningen

Om, gegeven de extincties bij een aantal verdunningen, een titer of het aantal ELISA-eenheden van een serum te berekenen, werd gebruik gemaakt van een minicomputer (zie hieronder). Hierbij werden in principe 2 soorten programma's gehanteerd. Het eerste hiervan diende om de gegevens van een assay vast te leggen. De input voor dit programma bestaat uit gegevens van de soort test, datum en nummer van uitvoering, beginverdunning en verdunningsfactor in de verdunningsreeksen, gegevens van de referentiesera en soort en nummer van de sera. Vervolgens werden de extincties ingelezen. Aanvankelijk gebeurde dit met de hand, later via een ponsband. Van deze extincties wordt de gemiddelde extinctie van de antigeencontroles afgetrokken. Vervolgens worden deze gegevens vastgelegd op disc.

De tweede soort programma's diende om aan de hand van deze gegevens berekeningen uit te voeren. In deze programma's wordt van alle sera, die in een assay zijn onderzocht, een dosis-respons curve berekend op basis van de gebruikte verdunningen en de daarbij behorende extincties (de meetpunten). In principe worden alle meetpunten van elk serum gebruikt voor de berekening. In de volgende gevallen worden echter meetpunten uitgesloten:

a. als de extinctie lager dan 0,025 of hoger dan 3,5 is; in dit geval wordt het bijbehorende meetpunt uitgesloten, omdat deze waarden onnauwkeurig zijn;

b. als een extinctie lager is dan die welke bij de naastvolgende, hogere verdunning wordt gevonden. Hierbij kunnen zich twee situaties voordoen: het betreffende meetpunt ligt aan het begin van de verdunningsreeks; in dit geval wordt dit meetpunt uitgesloten omdat het mathematische model 3 hieraan niet aangepast kan worden (voorbeeld: van de reeks extincties 1,9; 2,0; 1,6; 0,9 wordt de eerste uitgesloten. Een mogelijke oorzaak van een dergelijke curve is competitie door antilichamen van een andere klasse; zie Bijlage I.D.4.). Als daarentegen het meetpunt niet aan het begin van de reeks ligt, wordt verondersteld dat bij het meetpunt met de hogere extinctie een fout is opgetreden; in dit geval wordt dit meetpunt evenals alle volgende meetpunten van de verdunningsreeks uitgesloten (voorbeeld: van de reeks extincties 2,0; 1,2; 1,6; 1,1 worden de laatste twee uitgesloten).

De dosis-respons curven worden berekend volgens een van de volgende modellen:

$$L = E + b \log (d + c) \quad (\text{model 3a})$$

of één van de vereenvoudigde modellen:

$$L = E + b \log d \quad (\text{model 3b})$$

$$L = E + \log (d + c) \quad (\text{model 3c})$$

waarin d = verdunningsfactor

L = logarithme van de extinctie

E , b en c zijn parameters

De onderzoeker kan aangeven volgens welk model de berekeningen plaatsvinden (in ons onderzoek werd altijd gekozen voor model 3a). Dit hangt echter tevens af van het aantal bruikbare meetpunten en van de waarde van de gevonden parameters. Zo wordt, als in model 3a de uitkomst voor b groter is dan 1,2 of bij positieve sera kleiner dan 0,5, de berekening opnieuw uitgevoerd volgens model 3c. Als in een berekening c kleiner is dan 0 wordt opnieuw berekend volgens 3b (op theoretische gronden zijn deze waarden onwaar-

waarschijnlijk; zie Bijlage I.E.)).

Indien slechts één meetpunt bruikbaar is, wordt model 3b gebruikt, met een door de onderzoeker te geven waarde voor b. Invullen in 3b van de waarden van L en d van het betreffende meetpunt levert dan E. Bij twee meetpunten wordt, afhankelijk van de keus van de onderzoeker, model 3b of 3c gebruikt. Invulling van de waarden van a en d van de 2 meetpunten levert 2 vergelijkingen met 2 onbekenden, waarbij E en b, respectievelijk c rechtstreeks berekend worden. Dienovereenkomstig zouden bij model 3a, als 3 meetpunten bruikbaar zijn, de parameters rechtstreeks berekend kunnen worden; de 3 vergelijkingen met 3 onbekenden zijn echter dermate ingewikkeld dat in dit geval een benaderende berekening volgens de hieronder beschreven procedure wordt uitgevoerd.

Bij 3 of meer bruikbare meetpunten wordt de curve bij gebruik van model 3b berekend met behulp van lineaire regressie, volgens de methode van de kleinste kwadraten. Bij gebruik van model 3a en 3c wordt een iteratieve procedure toegepast. Verschillende waarden van c worden ingevuld en met behulp van lineaire regressie op L en $\log(d + c)$ worden de bijbehorende parameters E en b, en de standaardafwijking berekend. Op geleide van de standaardafwijking wordt de best passende curve met de bijbehorende parameters gezocht¹. Op grond van de zo berekende dosis-respons curve voor het referentieserum (negatief of positief controleserum) en van de, in een van de reeds beschreven programma's, opgegeven titer van het referentieserum, wordt de grenswaarde voor de berekening van de titer vastgesteld. Dan wordt het snijpunt van de curven van de overige sera met de grenswaarde berekend; dit komt overeen met de titer (zie 2.2.7.). Vervolgens wordt van elk serum het aantal E.U. berekend. Tenslotte worden per serum het nummer van de assay, soort en nummer van het serum, een code voor het gehanteerde rekenmodel, het aantal ELISA-units, de titer, de standaardafwijking volgens bovenstaande berekening, het aantal punten voor de berekening en de parameters van het rekenmodel weergegeven.

¹Het hier beschreven programma voor de berekening van de parameters van de dosis-respons curve, uitgaande van 3 of meer meetpunten (een subroutine in Fortran) is op aanvraag bij de auteur te verkrijgen.

De programma's kunnen worden aangepast voor verschillende indelingen van de assays. Er zijn programma's om op de resultaten een aantal statistische bewerkingen uit te voeren. De bovengenoemde programma's werden geschreven in FORTRAN en werden grotendeels door de auteur vervaardigd. De berekeningen werden uitgevoerd op de Digital Equipment PDP 11-45 van de afdeling Signaal en Data-Analyse (SDA) (Hoofd: Ir. J.C.M. Gruppings) van de afdeling Medische Informatie Verwerking van het St. Radboud-ziekenhuis.

2.3. *ANDERE SEROLOGISCHE ONDERZOEKMETHODEN*

2.3.1. Complementbindingsreactie (CBR)

De in 2.5.2. genoemde serumparen werden in het virologisch laboratorium van het St. Elisabeth Ziekenhuis in Tilburg op complementbindende antistoffen onderzocht. Als antigeen werd commercieel mycoplasma-antigeen (Microbiological Associates 30963) gebruikt. De CBR met de overige sera werd verricht in de afdeling Medische Microbiologie van het St. Radboud Ziekenhuis met behulp van een antigeen dat op dezelfde wijze was bereid als het antigeen voor ELISA. *M. pneumoniae* werd echter geoogst in het kweekmedium en niet verder bewerkt. In beide laboratoria werd de CBR volgens de LBCF-methode (1965) uitgevoerd met 5 eenheden complement. Als eenheid van complement wordt aangenomen de hoeveelheid complement die 50% hemolyse veroorzaakt ($C'H_{50}$).

2.3.2. Indirecte haemagglutinatie (IHA)

Deze reactie berust op het principe dat antilichamen tegen *M. pneumoniae* erythrocyten, die met *M. pneumoniae* zijn gesensibiliseerd, kunnen doen agglutineren (Dowdle en Robinson, 1964). In ons onderzoek werd voor deze reactie gebruik gemaakt van de commercieel verkrijgbare SERO-Diamyco (Fujizoki FD401). De test werd uitgevoerd volgens het voorschrift van de fabrikant, met dien ver-

stande dat de in de CBR negatieve sera werden gescreend in één verdunning (1:10). Voorts werd de reactie uitgevoerd met micropipetten in plaats van met de door de fabrikant voorgeschreven "loops". De sera werden niet geïnactiveerd.

Het omgekeerde van de hoogste (begin)verdunning van een serum, waarin nog duidelijk agglutinatie optrad in de vorm van een egaal netwerk van erythrocyten met soms wat verdikte randen, werd beschouwd als de titer van dat serum (Taylor, 1979).

2.3.3. Metabolic inhibition test (MIH)

De MIH berust op het principe dat *M. pneumoniae* glucose kan omzetten, waarbij zure produkten ontstaan. De pH-daling die hierbij optreedt, kan aangetoond worden met een indicator, in dit geval phenolrood, die hierbij geel wordt. De minimum hoeveelheid *M. pneumoniae* die nog juist een dergelijke kleuromslag teweeg brengt, noemt men een colour changing unit (CCU).

Groeiremmende of mycoplasmacide antilichamen in een serum kunnen deze kleuromslag verhinderen (Taylor-Robinson *et al.*, 1966).

De MIH werd uitgevoerd volgens het voorschrift van de "Working group of the FAO/WHO programme on Comparative Mycoplasmatology" (WHO, 1975). De FH-stam van *M. pneumoniae* (Liu, 1957) werd gekweekt zoals beschreven in 2.2.1.1. *M. pneumoniae* werd in het medium geogst en de suspensie werd vervolgens bij -70°C bewaard.

In de proef zelf werd kweekmedium I gebruikt. De sera werden gedurende 30 min. bij 56°C geïnactiveerd. In steriele microtiterplaatjes met ronde bodem (Greiner art. no. 650160) werden verdunningsreeksen in het kweekmedium gemaakt, 50 µl verdund serum per kommetje. Hieraan werd 100 µl kweekmedium en 50 µl van de hierboven beschreven suspensie van *M. pneumoniae* in een verdunning van 1:50 toegevoegd. Deze hoeveelheid kwam overeen met ongeveer 200 CCU; bij kweken op agar groeiden hieruit ongeveer 10^4 kolonies.

De proef werd afgelezen op het moment dat een controle zonder serum juist een kleuromslag te zien gaf die overeenkwam met een pH-daling van 0,5 (tot pH 7,3); dit was meestal na 3-5 dagen

incuberen bij 37°C het geval. Als titer werd beschouwd het omgekeerde van die verdunning van een serum, die nog juist de kleuromslag verhinderde (waarbij de pH-daling minder dan 0,25 bedroeg).

2.4. KWEKEN VAN *M. PNEUMONIAE*

Voor het kweken van *M. pneumoniae* uit patiëntenmateriaal werd de volgende methode gehanteerd.

Kweekmedium I (3 ml per buis) diende als transportmedium. Het werd bij 4°C bewaard gedurende ten hoogste één maand. Van patiënten bij wie het vermoeden bestond op infectie met *M. pneumoniae*, werd met een steriele wattenstok een keelafstrijk afgenomen door de wattenstok krachtig te strijken in de omgeving van de achterste gehemelteboog. De wattenstok werd daarna uitgedrukt tegen de glaswand van de buis met transportmedium, onder het vloeistofoppervlak. In sporadische gevallen werd ook uit sputum of bronchiaal secreet gekweekt. Zo snel mogelijk hierna, meestal binnen een uur, werd vanuit dit materiaal op voedingsbodems geënt en wel 0,1 ml op een Petrischaal met agar (kweekmedium IV) en 0,3 ml in diphasisch medium. De geënte voedingsbodems werden bij 37°C geïncubeerd. De rest van het transportmedium werd ingevroren en bewaard bij -70°C. Deze methode werd, op enkele detailwijzigingen na, overgenomen van het Rijks Instituut voor de Volksgezondheid te Bilthoven, mevrouw A. Polak-Vogelzang. De kweek werd als positief beoordeeld, indien de agar de typische groei van *M. pneumoniae* te zien gaf of het diphasisch medium een kleuromslag van rood naar geel toonde. Bij positieve kweek waren, met één uitzondering, steeds beide het geval; de kweek op agar was meestal na 5 à 10 dagen positief; die in het diphasisch medium meestal 1 à 2 dagen later. Eénmaal was alleen het diphasisch medium positief (na 30 dagen).

2.4.1. Identificatie van de stammen

Geïsoleerde stammen werden geïdentificeerd (zonedig na enkele passages in kweekmedium I) door middel van een groeiremmings-

test op agar. Hiertoe werd een Petrischaal met agar (kweekmedium IV) beënt met de gekweekte stam. Vervolgens werden hierop twee steriele schijfjes filtreerpapier gebracht. Op ieder van deze schijfjes werd 5 µl van een bij konijnen bereid antiserum gebracht, respectievelijk antiserum tegen *M. pneumoniae*-antigeen en antiserum tegen *M. pulmonis*-antigeen. Indien rond het eerste schijfje groeiremming optrad en rond het tweede niet, werd de stam beschouwd als *M. pneumoniae*. De eerste stam die door ons was geïsoleerd en als *M. pneumoniae* was geïdentificeerd, werd naar het Rijks Instituut voor de Volkgezondheid gezonden. De uitslag werd bevestigd (mevrouw A. Polak-Vogelzang).

2.5. SERA

De volgende groepen sera werden gebruikt.

2.5.1. Sera, die waren ingestuurd voor onderzoek op toxoplasmose of hepatitis

2.5.1.1. 150 sera, die afkomstig waren van patiënten van alle leeftijden

2.5.1.2. 115 sera, die afkomstig waren van patiënten tussen 2 en 10 jaar

2.5.2. Enkele groepen sera van patiënten, die waren ingestuurd voor onderzoek op respiratoire virussen (virologisch laboratorium van het St. Elisabeth Ziekenhuis te Tilburg)

2.5.2.1. 82 serumparen, waarvan beide sera in de CBR voor *M. pneumoniae* een titer hadden die kleiner was dan 4

2.5.2.2. 47 serumparen met een 4-voudige of grotere stijging in de CBR voor *M. pneumoniae*

2.5.2.3. 32 serumparen, waarvan beide sera in de CBR op *M. pneumoniae* een titer hadden die hoger was dan 64 en die geen titerstijging toonden

2.5.3. Sera van patiënten, bij wie een kweekproef was gedaan

2.5.3.1. Sera van 12 patiënten, bij wie een kweekproef was gedaan op grond van verdenking op infectie met *M. pneumoniae*

Tezamen met deze groep sera werden bovendien de sera van 1 patiënt onderzocht, bij wie geen kweekproef werd verricht, maar bij wie de diagnose pneumonie door *M. pneumoniae* op grond van klinisch beeld en röntgenologisch en serologisch onderzoek vaststond en van wie meerdere sera beschikbaar waren.

2.5.3.2. Sera van 8 pupillen van "De Binckhorst", Rosmalen, bij wie een keelwat met behulp van een kweekproef was onderzocht

"De Binckhorst" is een inrichting voor geestelijk gehandicapte jeugdigen waar in de tweede helft van 1979 een epidemietje van infecties met *M. pneumoniae* heerste.

2.5.4. Sera van 30 patiënten, die waren ingestuurd voor onderzoek op rheuma-factor

2.5.5. Sera voor sero-epidemiologisch onderzoek

2.5.5.1. Sera uit 1977

Voor de hoofdproef van het sero-epidemiologisch onderzoek werden sera gebruikt uit de groep sera, die in 1977 waren ingestuurd voor onderzoek op toxoplasma. Deze sera waren bij -20°C bewaard. Er werden 13 leeftijdsklassen gevormd (0-5 mnd., 6-11 mnd., 1 jaar, 2-3, 4-5, 6-9, 10-14, 15-19, 20-29, 30-39, 40-49, 50-59 en ouder dan 60 jaar). Bij de selectie van de sera werd de volgende procedure gevolgd.

Van iedere leeftijdsgroep werden op alfabetische volgorde 120

patiënten opgezocht, zoveel mogelijk gelijkelijk verdeeld over de beide geslachten. Indien niet voldoende patiënten in een bepaalde leeftijdsklasse werden gevonden, werd geprobeerd dit aantal aan te vullen met patiënten van wie het geslacht niet bekend was. Van al deze patiënten werd het eerste serum, dat in 1977 ingestuurd was, genomen. Vervolgens werden lijsten vervaardigd met de gegevens van serumnummer, datum van inzending van het serum, naam, geboortedatum en geslacht. Deze gegevens, met uitzondering van de naam, werden ingevoerd in de computer van het Universitair Reken Centrum.

De sera werden onderzocht op IgG-antistoffen in 80 assays. Per assay werd steeds het negatieve controleserum in duplo als referentie in een tevoren vastgestelde kolom (7) onderzocht. Daarnaast werden als controle het positieve controleserum in duplo en 18 te onderzoeken sera at random over het assay verdeeld. De toewijzing aan assays werd zodanig vastgesteld dat in iedere assay tenminste één (voorzover beschikbaar) en ten hoogste twee sera uit elke leeftijdsgroep werden onderzocht. De verdeling over en de plaatsing binnen de assays geschiedde door de computer met behulp van een randomiseringsprogramma (2.8.). In totaal werden op deze manier 1437 sera onderzocht. Parallel aan het onderzoek op IgG-antistoffen werden in 20 assays 360 sera op IgM-antistoffen onderzocht. De sera van 5 assays van het IgG-onderzoek werden in een later stadium nog onderzocht op IgG- en IgM-antistoffen met behulp van het Orion-antigeen. De sera van 4 van deze assays waren ook in de ELISA-IgM met het eigen antigeen onderzocht.

2.5.5.2. Sera uit 1979

Ter vergelijking met de resultaten met sera uit 1977 werden sera die in 1979 waren ingezonden voor onderzoek op toxoplasma, onderzocht. Hiervoor werden 120 sera van één leeftijdsgroep gebruikt, en wel de leeftijdsklasse 5 (4-5 jaar). De sera werden op dezelfde wijze geselecteerd en at random over 7 assays voor onderzoek in ELISA-IgG en -IgM verdeeld als beschreven is in 2.5.5.1.

2.6. FRACTIONERING VAN SERA IN SUCROSE-GRADIËNTEN

Voor onderzoek naar de klasse-specificiteit van IgM- en IgG-antilichamen werden enkele sera onderzocht na fractionering in sucrose gradiënten (5.2.). Hiervoor werden gebruikt een serum van een reconvalescent (3e serum van patiënte 4 van Tabel 7: serum A) en één van een gezonde persoon met een relatief hoge titer van IgG-antilichamen (26 E.U.) en een lage titer van IgM-antilichamen (2,5 E.U.) (serum B). Een deel van de fracties werd ook gebruikt voor een onderzoek naar competitie tussen IgG- en IgM-antilichamen (5.3.) en voor onderzoek in de IHA (5.2.). De fractionering geschiedde als volgt:

0,2 ml onverdund serum werd op een gradiënt van 10-30% sucrose in een centrifugebuis gebracht. Na centrifugeren bij 286.500 g (R_{max}) gedurende 25 uur bij 4°C in de SW 41 Ti rotor van een Beckman L5-65 centrifuge werden 20 fracties verzameld, ieder van ongeveer 0,6 ml.

2.7. REFERENTIESERA

2.7.1.1. Zwak positief controleserum

Uit 15 sera uit de groep 2.5.1.1., die een lage extinctie hadden, werd een serumpool samengesteld. Hoewel het in de bedoeling lag dat deze pool geen specifieke antilichamen zou bevatten, bleek dat deze serumpool duidelijk hogere extincties had, dan als negatief te beschouwen sera en ook hogere extincties had bij gebruik van *M. pneumoniae*-antigeen dan bij gebruik van controleantigeen.

Deze serumpool zal in het vervolg worden aangeduid als zwak positief controleserum. In de eerste proeven met ELISA-IgM (Hoofdstuk 5) werd deze serumpool gebruikt als referentieserum voor de berekening van titers. Uit afzonderlijk uitgevoerde titraties bleek de titer in ELISA-IgM 125 te bedragen, overeenkomend met 2,5 E.U.

2.7.1.2. Negatief controleserum voor ELISA-IgG

Uit de sera uit groep 2.5.1.2. werden 58 sera met een lage extinctie geselecteerd. Met deze sera werd een serumpool samengesteld. Evenals de vorige, maar in geringere mate, bleek ook deze serumpool een hogere extinctie in ELISA-IgG met *M. pneumoniae*-antigeen te tonen dan de meeste negatieve sera en dan met controle-antigeen. In feite was deze serumpool een "borderline pool": de activiteit in ELISA-IgG ligt slechts weinig boven de grens tussen negatieve en positieve sera.

Deze serumpool werd voor ELISA-IgG als referentieserum voor berekening van titers gebruikt en zal worden aangeduid als negatief controleserum (voor ELISA-IgG). De titer werd gesteld op 50 (1 E.U.).

2.7.1.3. Negatief controleserum voor ELISA-IgM

Uit een groep sera van 36 pupillen van "De Binckhorst" die niet in nauw contact waren geweest met patiënten met *M. pneumoniae*-infecties werden 13 sera geselecteerd met lage extincties in ELISA-IgM. Hieruit werd een serumpool samengesteld. Deze bleek, evenals het negatieve serum voor ELISA-IgG, een "borderline pool" te zijn.

Deze serumpool werd in de meeste ELISA-IgM-proeven als referentieserum voor berekening van titers gebruikt en zal worden aangeduid als negatief controleserum (voor ELISA-IgM). De titer werd vastgesteld op 50 (1 E.U.).

2.7.2.1. Sterk positief controleserum

Uit de sera 2.5.2.2. en 2.5.2.3. met een titer tussen 64 en 512 in de CBR werd een positieve serumpool samengesteld. Al snel bleek dat deze pool zeer hoge waarden in de ELISA-IgG te zien gaf waardoor deze pool minder goed bruikbaar was als positief controleserum. Wel werd dit serum nog in een aantal van de in Hoofdstuk 5 beschreven proeven als positief controleserum in ELISA-IgM gebruikt.

Deze pool zal worden aangeduid als sterk positief controleserum.

2.7.2.2. *Positief controleserum voor ELISA-IgG*

Het positieve controleserum voor ELISA-IgG werd samengesteld uit 21 sera uit groep 2.5.1.1. die duidelijk verhoogde extincties in de ELISA-IgG hadden.

2.7.2.3. *Positief controleserum voor ELISA-IgM*

Het positieve controleserum voor ELISA-IgM werd samengesteld uit 10 sera uit groep 2.5.2.1. met matig hoge titers in ELISA-IgM. Behalve in enkele proeven, beschreven in Hoofdstuk 5, werd deze serumpool in alle ELISA-IgM-proeven als positieve controle gebruikt.

2.8. *STATISTISCHE METHODEN*

Verschillende, algemeen gebruikelijke statistische methoden werden toegepast. Eén van de meest gebruikte was die van regressieberekening volgens de methode van de kleinste kwadraten met gelijke gewichten van de variabelen. Indien een minder gebruikelijke statistische methode wordt gebruikt, wordt dit in de tekst vermeld.

De statistische bewerkingen ten behoeve van Hoofdstuk 4 en van het sero-epidemiologisch onderzoek werden uitgevoerd door de Mathematisch Statistische Adviesafdeling van de Katholieke Universiteit te Nijmegen (Dr. R. de Graaf, Dr. J.A.M. van Druten en A.G.M. Reintjes). Voor de berekeningen werd gebruik gemaakt van de computer van het Universitair Reken Centrum van deze universiteit.

OPZET EN UITVOERING VAN DE ELISA VOOR MYCOPLASMA PNEUMONIAE

Bij het begin van het onderzoek bestond er in het Instituut voor Medische Microbiologie ervaring met indirecte ELISA-IgG en ELISA-IgM voor antilichamen tegen andere micro-organismen, o.a. toxoplasma en cytomegalovirus (van Loon en van der Veen, 1980; van Loon *et al.*, 1981). Er was al onderzoek gedaan naar het effect van een groot aantal variabele factoren, zoals verdunningsvloei-stoffen, incubatietijden, invloed van het soort microtiterplaatjes en samenstelling van het substraat op de uitkomsten van ELISA. Verder waren er bruikbare anti-IgG- en anti-IgM-conjugaten geselecteerd. Wij besloten van de zo ontwikkelde procedure uit te gaan bij de ontwikkeling van de ELISA voor *M. pneumoniae*.

Nu kon worden volstaan met het bereiden en onderzoeken van een geschikt antigeen en het bepalen van optimale antigeen- en conjugaatverdundingen door middel van bloktitraties. In een later stadium van het onderzoek werd alsnog besloten onderzoek te doen naar de invloed van het toevoegen van verschillende stoffen aan de verdunningsvloei-stoffen voor sera en conjugaat.

3.1. ANTIGEEEN

De bereiding van *M. pneumoniae*-antigeen en controle-antigeen (*M. pulmonis*) werd beschreven in Hoofdstuk 2.2.1.1. Controle-antigeen en *M. pneumoniae*-antigeen werden in de proeven gebruikt in verdundingen, waarbij beide antigenen een gelijke eiwitconcentratie (bepaald volgens Lowry) hadden.

Met het "gewassen" *M. pneumoniae*-antigeen dat aanvankelijk zonder soniceren of lyseren in ELISA-IgG werd onderzocht, gaf het sterk positieve controleserum (2.7.2.1.) duidelijk verhoogde extincties, vergeleken met het zwak positieve controleserum (2.7.1.1.) en met controle-antigeen. De verhouding tussen deze extincties (de ratio) bedroeg ongeveer 4:1 à 5:1 bij een serumverdunding van 1:100. Hoewel dit antigeen bruikbaar leek te zijn,

werden hogere ratio's verkregen indien het antigeen gelyseerd werd en in het bijzonder als het met ultrason behandeld werd. Dit effect berustte vooral op verlaging van de extinctie van het zwak positieve controleserum. Wij hebben vervolgens nagegaan of de gecombineerde behandeling van soniceren en lyseren een verdere verbetering gaf ten opzichte van ieder van deze behandelingen afzonderlijk. Hoewel de verschillen klein waren, was dit inderdaad het geval.

Er werd daarom besloten bij de verdere proeven antigeen te gebruiken dat eerst met ultrason was behandeld en daarna gelyseerd was. Door middel van bloktitraties van dit antigeen en conjugaat werd de optimale verdunning van dit antigeen bepaald. Deze bleek bij de eerste "batch" 1:7,5 te bedragen. Dit kwam overeen met een eiwitgehalte van 6 µg/ml (eiwitbepaling volgens Lowry). Ook voor latere batches antigeen bleek de optimale eiwitconcentratie bij 5-7,5 µg/ml te liggen.

Ditzelfde antigeen bleek in dezelfde verdunning geschikt voor ELISA-IgM.

De eiwitconcentratie van de optimale antigeenverdunning (5-7,5 µg/ml) is lager dan die door Salonen en Vaheri (1979) werd gevonden (37,5 µg/ml). Deze resultaten zijn echter niet goed met elkaar vergelijkbaar, doordat het antigeen in dit laatste onderzoek op een andere manier was gezuiverd.

3.2. ELISA-PROCEDURE: VERDUNNINGSVLOEISTOFFEN

De procedure voor de ELISA was in principe gelijk aan de methode die in Hoofdstuk 2.2. is beschreven.

In de eerste proeven werd 2% geïnactiveerd foetaal kalverserum (FCS) toegevoegd aan de verdunningsvloeistoffen voor sera en conjugaat. Om na te gaan of door wijziging van de samenstelling van de verdunningsvloeistof specifieke reacties konden worden onderdrukt, werden proeven verricht, waarbij FCS werd vervangen door 10% geïnactiveerd nuchter kalverserum (KAS) of door kweekmedium (medium II, 2.1.1.2.).

Met 10% KAS werd geen duidelijke verbetering verkregen. Met medium II bleken alle extincties sterk verlaagd te zijn. Omdat wij

vermoedden dat glucose door zijn reducerende werking de enzymactiviteit van het conjugaat beïnvloedde, werd deze stof weggelaten. Ook werd penicilline weggelaten vanwege zijn geringe stabiliteit. Het zo gewijzigde kweekmedium wordt aangeduid als medium III (2.1.1.3.).

Bij toevoeging van medium III aan de verdunningsvloeistoffen van sera en conjugaat werd een duidelijke verbetering van de ratio's, zowel in ELISA-IgG als in ELISA-IgM, bereikt. In een bloktitratie werd vervolgens bepaald welke concentratie van medium III (in de verdunningsvloeistoffen) optimaal was. Het bleek dat de beste resultaten werden bereikt met 40% medium III voor het verdunnen van sera en 10% medium III voor het verdunnen van conjugaat.

Een mogelijke verklaring van de betere resultaten na toevoeging van medium III is de volgende:

Mycoplasma pneumoniae kan uit het medium waarin het gekweekt wordt componenten met antigene eigenschappen in zijn celwand opnemen (Sethi en Brandis, 1971). Ten gevolge hiervan kunnen, ook na optimale zuivering, aspecifieke antigene componenten in het *M. pneumoniae*-antigeen achterblijven. Het is mogelijk dat hierdoor aspecifieke reacties met serum en conjugaat optreden. Door toevoeging van medium III, waarvan de samenstelling vrijwel gelijk is aan het kweekmedium, wordt de kans op deze aspecifieke reacties verminderd.

3.3. CONCLUSIE

Voor de bereiding van *M. pneumoniae*-antigeen voor ELISA kan men gebruik maken van *M. pneumoniae* dat op een glaswand is gekweekt en, nadat het kweekmedium is verwijderd, eerst met ultrasoon is behandeld en daarna gelyseerd. Het antigeen dient te worden gebruikt in een verdunning, die 5-7,5 µg eiwit per ml bevat. Toevoeging van de belangrijkste componenten van het medium, waarin het antigeen gekweekt werd, aan de vloeistoffen waarin sera en conjugaten worden verdund, heeft een gunstige invloed op de uitkomsten van de proeven.

MATHEMATISCHE MODELLEN VOOR DE RELATIE TUSSEN EXTINCTIE EN
SERUMVERDUNNING IN ELISA

Een van de problemen bij de toepassing van ELISA voor het aantonen van specifieke antilichamen is de vraag op welke wijze de resultaten moeten worden weergegeven. Sommige auteurs gebruiken waarden die zijn afgeleid van de gemeten extinctie (Gilman en Docherty, 1977; Ruitenbergh en van Knapen, 1977; Miranda *et al.*, 1977; Wolters *et al.*, 1977). Anderen bepalen waarden door middel van een eindpunttitratie, waarbij het eindpunt op verschillende manieren wordt vastgesteld (Gravell *et al.*, 1977; Gilman en Docherty, 1977; Yolken *et al.*, 1978; van Loon en van der Veen, 1980). Waarden die zijn gebaseerd op de afstand tussen curven, worden gehanteerd door Leinikki *et al.* (1977, 1979) in de "effective dose" (E.D.) methode. Dit principe wordt ook toegepast om de absolute hoeveelheid specifiek IgG te meten (Leinikki *et al.*, 1978). Een overzicht van de verschillende in gebruik zijnde methoden werd onlangs door de Savigny en Voller (1980) gegeven.

In verband met de verwerking van grote aantallen sera (ten behoeve van het sero-epidemiologisch onderzoek) was het de vraag, of zou kunnen worden volstaan met onderzoek van één of enkele verdunningen, zo nodig in duplo, om een goed kwantitatief inzicht in de hoeveelheid aanwezige specifieke antistoffen tegen *M. pneumoniae* te krijgen, dit in navolging van van Loon en van der Veen (1980) en de Savigny en Voller (1980), die de ELISA uitvoeren met één enkele verdunning in duplo in combinatie met een standaard-curve.

Om op een eenvoudige, inzichtelijke manier te kunnen weergeven hoeveel antistoffen een serum bevat en om te kunnen beslissen hoeveel serumverdunningen moeten worden onderzocht, is het nodig een zo goed mogelijk inzicht te krijgen in de relatie tussen de verdunning van een serum en de bijbehorende extincties in ELISA. Deze relatie kan in de vorm van een dosis-respons curve worden weergegeven, met als meetpunten, de verdunningen met de bijbehorende extincties. Wij analyseerden het verloop van deze dosis-

respons curve bij een aantal sera in reeksen van 11 tweevoudige verdunningen in de ELISA-IgG met behulp van drie mathematische modellen.

Vier assays, met telkens 8 sera, waaronder altijd het negatieve controleserum (neg., 2.7.1.2.) en het positieve controleserum (pos., 2.7.2.2.) werden ingezet. De overige onderzochte sera omvatten het sterk positieve (st. pos., 2.7.2.1.) en het zwak positieve controleserum (zw. pos., 2.7.1.1.); sera van reconvalescenten (R, uit groep 2.5.2.2.) en sera ingezonden voor onderzoek op toxoplasmose en hepatitis (aangeduid met T, resp. H, uit groep 2.5.1.1.). In tabel 4.1. en 4.3. is aangegeven tot welke groep de onderzochte sera behoorden.

De ELISA-IgG werd uitgevoerd, zoals is aangegeven in Hoofdstuk 2.2. met de volgende modificaties.

Sera en conjugaat werden in een oplossing van FCS 2% in PBS/Tween verdund. De sera werden verdund in 2-voudige reeksen van 1:25 tot 1:25600. De extincties, gemeten in de Multiskan werden gecorrigeerd, door hiervan het gemiddelde af te trekken van de extincties in de kommetjes zonder serum (de antigeencontroles) onder uitsluiting van de laagste en de hoogste waarde (in plaats van de hoogste 2 waarden, zoals beschreven in 2.2.). Van berekening werden uitgesloten de verdunningen waarin de gecorrigeerde extincties lager waren dan 0,02. In tegenstelling tot wat in 2.2.8. werd beschreven, werden meetpunten, waarvan de extinctie lager was dan die bij de naastvolgende hogere verdunningen, indien zij aan het begin van een verdunningsreeks lagen, niet uitgesloten van de berekeningen. Wel werd op dezelfde wijze als in 2.2.8. gehandeld als dit het geval was verder in het verloop van een verdunningsreeks: dan werden de meetpunten vanaf het punt met de hogere extinctie uitgesloten. Een verantwoording van deze handelwijze wordt in de discussie gegeven.

Tenslotte werden de volgende beperkingen toegepast:

Positieve sera werden alleen in de berekeningen opgenomen als na deze uitsluitingen tenminste 8 bruikbare meetpunten overbleven (13 sera); voor negatieve sera moesten tenminste 6 bruikbare meetpunten overblijven (13 sera).

De volgende mathematische modellen werden gebruikt:

•Model 1:

$$L(x) = E + (b - 1)x - fe^{-gx}$$

waarin: $L(x) = {}^{10}\log$ (extinctie)

$x = {}^{10}\log$ (verdunningsfactor d)

•Model 2:

$$L(x) = E - x + {}^{10}\log \left(\frac{10^{\alpha+\beta x}}{1 + 10^{\alpha+\beta x}} \right)$$

•Model 3:

$$L(x) = E + (b - 1) {}^{10}\log (10^x + c)$$

Voor informatie over de theoretische achtergrond van deze modellen zij verwezen naar Bijlage I.

De resultaten werden met behulp van een niet-lineaire regressie procedure (programma FARMFIT van het Universitair Reken Centrum van de Katholieke Universiteit) geanalyseerd. Aan de meetpunten $(x_i, L(x)_i)$ werden gelijke gewichten toegekend. De modellen werden onderling vergeleken op grond van de residuele kwadraatsommen. Met behulp van asymptotische toetsen, gebaseerd op residuele kwadraatsommen, of op parameterschattingen en hun standaardfouten werd bovendien onderzocht of de modellen 1 en 3 vereenvoudigd konden worden door vermindering van het aantal parameters (Dr. R. de Graaf, Mathematisch Statistische Adviesafdeling, opdracht no. 79029).

RESULTATEN

Als eerste stap werden de extincties tegen de verdunningen uitgezet op een dubbellogarithmische schaal. Als voorbeeld wordt het resultaat van assay 2 in Fig. 4.1. weergegeven. De sera, met een curve boven die van het negatieve controleserum, werden als positief beschouwd, de overige als negatief. Eén serum (2-8) had een curve, die gedeeltelijk onder en gedeeltelijk boven de curve van de negatieve controle lag; dit werd als zwak positief beschouwd, maar bij de berekeningen als negatief behandeld.

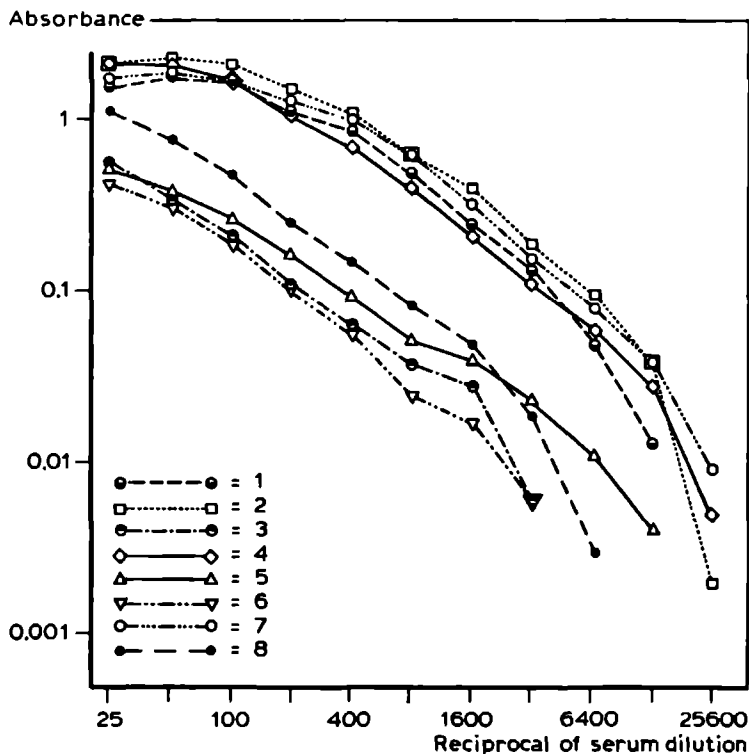


Fig. 4.1. Dosis-respons curven in ELISA

De resultaten van assay 2 zijn weergegeven. De cijfers verwijzen naar de bijhorende sera (Tabel 4.1. en 4.3.). De sera 1, 2, 4 en 7 zijn positief, serum 8 is zwak positief en de sera 3, 5 en 6 zijn negatief voor specifieke IgG-antilichamen.

Positieve sera

•Model 1:

Voor alle 13 sera is de aanpassing van model 1 zeer fraai. Een voorbeeld hiervan geeft Fig. 4.2.a. Toch beantwoordt dit model niet aan de verwachting, dat het lineaire deel $L(x) = E + (b - 1)x$ samen zou vallen met het min of meer rechtlijnig verloop van de curve in de hogere verdunningen (waarbij de exponentiële term dan zou moeten corrigeren voor de afwijking van de lineariteit in lagere verdunningen, zie Bijlage I.C.). De gevonden kleinste kwadraatschattingen \hat{E} en \hat{b} zijn zodanig dat dit niet het geval is.

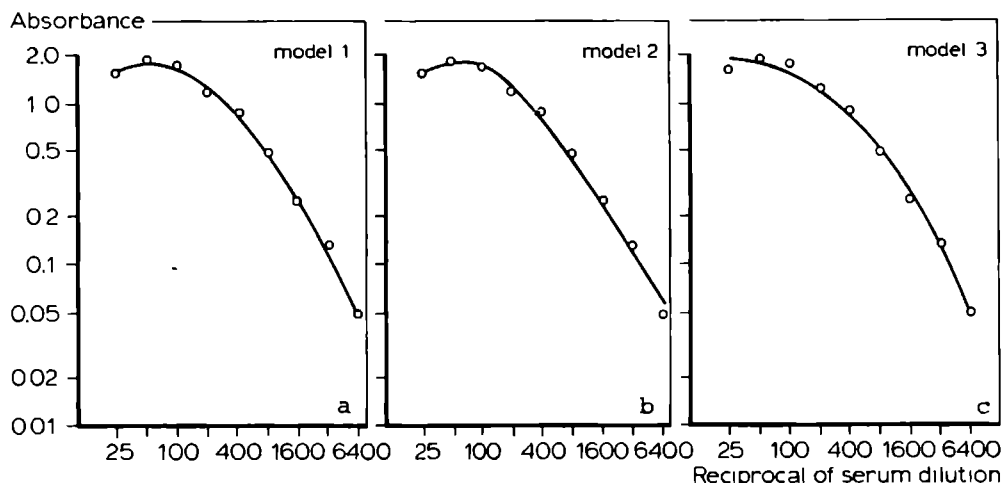


Fig. 4.2. Best passende curven volgens drie mathematische modellen

Als voorbeeld zijn de best passende curven voor de meetpunten van een positief serum (2-1) weergegeven.

In 2 van de 13 gevallen (sera 1-3 en 3-8) is de kleinste kwadratschatter \hat{b} zelfs groter dan 1 en de kleinste kwadratenschatter \hat{g} van de parameter g negatief. In deze gevallen is dus de helling van het lineaire deel van de curve positief en vindt er eerder aansluiting plaats bij de eerste meetpunten. De exponentiële term geeft dan de afwijking van de latere punten t.o.v. deze lijn aan. Deze afwijking neemt toe bij hogere verdunningen.

De gevonden schattingen van de parameters E en f liggen vaak dicht bij elkaar. Daarom werd onderzocht of een vereenvoudigd model met 3 parameters waarin $f = E$ een even goede aanpassing geeft. Getoetst werd de hypothese:

$$H_1 : f = E$$

met behulp van een asymptotische F-toets welke gebaseerd is op de residuele kwadratensom onder het oorspronkelijke model en die onder het vereenvoudigde model (met $f = E$).

Voor 9 van de 13 sera was het vereenvoudigde model significant slechter ($p \leq 0,05$) en éénmaal bijna significant slechter

($p = 0,06$). Bovendien bleek dat onder dit model (met $f = E$) bij de meeste sera de helling van het lineaire deel positief was en de exponentiële term toenam met de verdunningsfactor.

Vervolgens werd nagegaan of de exponentiële term onmisbaar is. Hiertoe werd getoetst de hypothese:

$$H_2 : f = 0$$

met een asymptotische t-toets, gebaseerd op de kleinste kwadraten-schatting van f en de bijbehorende standaardfout. Dit leverde in 7 van de 13 gevallen een significant beter resultaat voor het oorspronkelijke model ($p < 0,01$). Bij de overige sera was $p > 0,10$.

Toetsing van de hypothese:

$$H_3 : b = 0$$

levert slechts in 2 gevallen een (bijna) significant resultaat ($p < 0,01$ en $p = 0,07$). b is echter in 11 van de 13 gevallen kleiner dan 0 (zie Tabel 4.1.). Dit wijst er op dat b toch een noodzakelijke correctie is.

Hoewel de aanpassing van model 1 aan de gegevens zeer fraai is, zijn de standaardfouten van de parameters relatief gezien zeer groot (Tabel 4.1.). Dit wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van hoge correlaties tussen de parameter-schattingen. Model 1 zal alleen gebruikt worden als referentie voor de andere modellen.

•Model 2:

•Model 2:

Dit model is de expliciete vorm van een logit-log model (zie Bijlage I). Het blijkt een goede aanpassing te geven, met name ook van de eerste meetpunten. Het allerlaatste meetpunt daarentegen ligt vaak op vrij grote afstand van de kromme m.a.w. er is een extra "doorbuiging" aan het eind, die in veel gevallen door het model niet wordt gevolgd (een voorbeeld hiervan geeft Fig. 4.2. b).

De parameters α en β leveren schattingen op in de buurt van -2,5 en 1. Hun standaardfouten bedragen daarbij meestal niet meer dan 5 à 10%. De resultaten voor de parameter E zijn in Tabel 4.1. weergegeven. De waarde van deze parameter lijkt zeer nauwkeurig

Tabel 4.1. Positieve sera: kleinste kwadraten-schattingen met de standaardfouten voor de parameters E en b

Serum no. ¹	Soort serum ²	Model 1		Model 2	Model 3	
		E	b	E	E	b
1-1	H	5,1 ± 6,5	-0,6 ± 1,1	2,18 ± 0,03	2,7 ± 0,4	-0,15 ± 0,12
1-3	st.pos.	0,2 ± 0,1	1,2 ± 0,2	2,89 ± 0,03	3,4 ± 0,3	-0,11 ± 0,08
1-4	pos.	2,4 ± 0,2	-0,02 ± 0,05	2,31 ± 0,01	2,5 ± 0,2	-0,06 ± 0,04
2-1	T	9,3 ± 6,4	-1,2 ± 0,9	2,59 ± 0,03	4,0 ± 0,5	-0,38 ± 0,12
2-2	T	8,3 ± 3,2	-0,9 ± 0,4	2,77 ± 0,02	3,4 ± 0,2	-0,16 ± 0,05
2-4	pos.	2,8 ± 0,2	-0,04 ± 0,04	2,56 ± 0,01	2,6 ± 0,1	-0,01 ± 0,03
2-7	H	6,5 ± 2,6	-0,7 ± 0,4	2,72 ± 0,01	3,4 ± 0,2	-0,18 ± 0,05
3-4	pos.	8,2 ± 5,0	-0,1 ± 0,7	2,54 ± 0,01	3,2 ± 0,2	-0,19 ± 0,06
3-7	T	4,0 ± 1,3	-0,2 ± 0,2	2,81 ± 0,02	2,3 ± 0,1	0,12 ± 0,02
3-8	R	37 ± 205	4,6 ± 10,8	2,05 ± 0,02	2,3 ± 0,1	-0,08 ± 0,04
4-3	pos.	4,4 ± 2,8	-0,5 ± 0,5	2,23 ± 0,02	3,0 ± 0,4	-0,23 ± 0,11
4-7	T	107 ± 706	-6,5 ± 25,2	2,51 ± 0,02	3,3 ± 0,3	-0,21 ± 0,07
4-8	R	4,3 ± 1,4	-0,4 ± 0,3	2,32 ± 0,01	2,7 ± 0,2	-0,09 ± 0,04

¹Nummer van het assay en plaats van het serum in het assay

²(st.)pos. = (sterk) positief controleserum

H = serum ingezonden voor onderzoek op hepatitis

T = serum ingezonden voor onderzoek op toxoplasmose

R = serum van patiënt met M. pneumoniae-infectie

vast te stellen. Bovendien blijkt dat voor de verschillende sera de waarden van de parameter E goed overeen komen met de onderlinge niveaus van de curven bij hogere verdunningen ($\geq 1:200$), d.w.z. een hoger liggende curve resulteert in een hogere E-schatting.

•Model 3:

Dit model blijkt redelijk goed te voldoen. De aanpassing van de eerste 3 meetpunten (verdunning $\leq 1:100$) is over het algemeen

slecht. Een voorbeeld van de aanpassing geeft Fig. 4.2.c.

Onderzocht werd of de parameter b in dit model, als een correctie op de helling noodzakelijk is. De hypothese:

$$H_4 : b = 0$$

werd met behulp van een asymptotische t -toets getoetst. Deze hypothese werd in veel gevallen verworpen (6 maal $p \leq 0,03$; 3 maal $p = 0,08$; 4 maal $p > 0,10$). Bovendien was in 12 van de 13 gevallen b negatief. We concluderen dat weglating van b een slechter model zou geven.

De hypothese:

$$H_5 : c = 0$$

werd in alle gevallen verworpen ($p \leq 0,02$, meestal $\leq 0,002$). Alle schattingen van c zijn significant positief, variërend van 80 tot 1000, terwijl dan hun standaardfouten maximaal 30% bedragen.

De schattingsresultaten voor de parameters E en b staan in Tabel 4.1. Hoewel de standaardfouten van de parameter E niet groot zijn, zijn ze toch minder nauwkeurig dan bij model 2. Bovendien blijken de waarden ervan niet goed overeen te komen met de onderlinge niveaus van de curven in het gebied van de hogere verdunningen; een hoger liggende curve geeft soms een lagere schatting voor E . De waarden van E in dit model zijn met uitzondering van serum 3-8 groter dan die van E in model 2; volgens de tekentoets is er sprake van een systematisch verschil ($p < 0,01$).

•Modelvergelijking:

De kleinste gevonden sommen van de kwadratische residuen zijn in Tabel 4.2. weergegeven. Zowel in vergelijking met model 2 als met model 3 blijkt model 1 over het algemeen de beste aanpassing te geven, namelijk voor 11 van de 13 sera. Volgens de tekentoets bestaat er dan een significante voorkeur voor model 1 ($p < 0,05$). Hierbij dient opgemerkt te worden dat model 1 is gebaseerd op 4 parameters en de andere 2 modellen op slechts 3 parameters. Bij model 2 lijkt vaak een systematische afwijking op te treden voor het laatste meetpunt, terwijl model 3 vaak een afwijking toont in

Tabel 4.2. Positieve sera: minimale kwadraatsommen voor de residuen ten aanzien van de drie modellen

Serum	Minimale kwadraatsommen x 10 ⁴			
	Aantal meetpunten	Model 1	Model 2	Model 3
1-1	8	64	81	87
1-3	10	20	162	127
1-4	9	16	13	53
2-1	9	34	137	107
2-2	10	16	84	58
2-4	10	12	32	43
2-7	10	36	56	48
3-4	8	6	9	14
3-7	11	33	55	31
3-8	8	4	49	26
4-3	8	39,0	38,5	60
4-7	8	27	28	24
4-8	9	17	32	35

het begin van het meetgebied. Onderlinge vergelijking van model 2 en model 3 op grond van de residuele kwadraatsommen leidt niet tot een voorkeur voor één van beide.

Negatieve sera

Bij de negatieve sera waren 13 sera geschikt voor verder onderzoek; de indeling naar soort serum is in Tabel 4.3. weergegeven.

Eén serum (3-2) toonde een afwijkend verloop van de curve; het laatste deel (bij hogere verdunningen) verliep vlak.

•Model 1:

Met model 1 werden zeer goede aanpassingen bereikt. Alleen ten aanzien van serum 2-3 kon geen goed resultaat worden bereikt.

De hypothese:

$$H_2 : f = 0$$

geeft slechts bij 1 van de 12 bruikbare curven een significante uitslag ($p = 0,04$); bij de overige 11 is $p > 0,10$. De exponentiële term lijkt, in tegenstelling tot de situatie bij de positieve sera, niet erg noodzakelijk.

De schatting van b viel voor 3 sera negatief uit, maar week niet significant af van 0 ($p > 0,10$). Voor de 10 positieve waarden van b was deze waarde 5 keer significant groter dan 0 ($p < 0,05$). De hypothese:

$$H_3 : b = 0$$

moet derhalve worden verworpen. Voor deze negatieve sera vinden we dus over het algemeen een positieve correctie voor de helling van het lineaire deel; bij de positieve sera was deze correctie meestal negatief. De waarde van $(b - 1)$ is altijd negatief, in tegenstelling tot de situatie bij positieve sera.

De parameterschattingen voor E en b tonen relatief grote standaardfouten (Tabel 4.3.), zodat het niet mogelijk is één van de parameters te gebruiken als maat voor de concentratie van specifieke antilichamen. Bovendien corresponderen de E -schattingen niet met de onderlinge niveaus van de curven.

•Model 2:

Model 2 geeft, behalve voor serum 3-2 en in mindere mate voor serum 2-3, in het hele meetgebied een goede aanpassing. Deze 2 sera worden bij de volgende overwegingen buiten beschouwing gelaten.

De schattingen voor de parameters α en β leveren waarden op van respectievelijk -1,3 tot -2,6 en 0,5 tot 1,5. Hun standaardfouten bedragen meestal niet meer dan 10-20% (dat is iets hoger dan bij de positieve sera werd gevonden). Voor de negatieve sera blijken -evenals voor de positieve sera- de schattingen van E goed overeen te komen met de niveaus van de reeksen meetpunten. Bovendien zijn de standaardfouten vaak erg gering (in 8 gevallen <5%, zie Tabel 4.3.).

Tabel 4.3. Negatieve sera: kleinste kwadraten-schattingen met de standaardfouten voor de parameters E en b

Serum no. ¹	Soort serum ²	Model 1		Model 2	Model 3	
		E	b	E	E	b
1-5	neg.	1,1 ± 0,1	0,16 ± 0,04	1,63 ± 0,05	1,3 ± 0,1	0,10 ± 0,05
1-7	T	0,0 ± 0,1	0,56 ± 0,03	2,54 ± 0,30	0,1 ± 1,0	0,52 ± 0,03
1-8	T	1,3 ± 0,2	0,06 ± 0,06	1,50 ± 0,02	1,7 ± 0,3	-0,06 ± 0,09
2-3	T	0,8	0,25	7	0,8 ± 0,2	0,24 ± 0,06
2-5	neg.	1,7 ± 0,6	0,01 ± 0,15	1,66 ± 0,01	1,4 ± 0,1	0,08 ± 0,02
2-6	T	2,3 ± 2,7	-0,29 ± 0,66	1,33 ± 0,02	1,8 ± 0,2	-0,16 ± 0,08
2-8	zw.pos.	1,3 ± 0,1	0,20 ± 0,03	2,04 ± 0,13	1,4 ± 0,1	0,17 ± 0,03
3-2	T	0,5 ± 0,1	0,27 ± 0,06	9	0,2 ± 0,1	0,45 ± 0,05
3-5	neg.	0,7 ± 0,0	0,32 ± 0,01	1,60 ± 0,06	1,3 ± 0,2	0,09 ± 0,07
4-2	T	-0,3 ± 0,4	0,84 ± 0,36	1,42 ± 0,06	3,4 ± 1,3	-0,63 ± 0,42
4-4	T	0,5 ± 0,3	0,27 ± 0,10	1,45 ± 0,21	0,7 ± 0,3	0,22 ± 0,10
4-5	neg.	2,4 ± 5,6	-0,25 ± 1,26	1,39 ± 0,03	1,5 ± 0,3	-0,05 ± 0,11
4-6	T	3,3 ± 4,7	-0,36 ± 0,94	1,64 ± 0,03	2,1 ± 0,6	-0,15 ± 0,17

¹Nummer van het assay en plaats van het serum binnen het assay

²neg. = negatief controleserum

zw. pos. = zwak positief controleserum

T = serum ingezonden voor onderzoek op toxoplasmose

•Model 3:

Dit model geeft in de meeste gevallen over het hele meetgebied een goede aanpassing. Ook de aanpassingen ten aanzien van de sera 2-3 en 3-2 zijn redelijk. De schattingen voor de parameter c liggen meestal tussen 0 en 70. Twee schattingen waren hoger (203 en 267), terwijl voor serum 3-2 de waarde -12 werd gevonden. Toetsing van de hypothese:

$$H_5 : c = 0$$

levert 6 keer een min of meer significante uitslag op ($0,001 \leq p \leq 0,08$), terwijl 7 keer een $p > 0,10$ werd gevonden. De parameter c lijkt dus een wezenlijke verbetering te geven.

De parameter b had 4 keer een significante positieve waarde ($p \leq 0,02$) en 1 keer een bijna significante positieve waarde ($p = 0,10$). Van de overige 8 waarden waren er 5 negatief; geen van deze 8 verschilde significant van 0 (zie Tabel 4.3.). De hypothese:

$$H_4 : b = 0$$

wordt dus voor 4 van de 13 negatieve sera verworpen. Opgemerkt moet worden dat voor de negatieve sera de waarden van b dus vaker positief dan negatief uitvallen, dit in tegenstelling tot de positieve sera.

Ten aanzien van de parameter E in model 3 kunnen voor de negatieve sera dezelfde conclusies worden getrokken als voor de positieve sera: de waarden van E komen niet goed overeen met de onderlinge niveaus van de curven (Tabel 4.3.).

Modelvergelijking

In Tabel 4.4. zijn voor elk van de 3 modellen de waarden van de kleinst gevonden sommen van de kwadratische residuen gegeven. Volgens de tekentoets bestaat er een significante voorkeur voor model 1 ten opzichte van model 2 en 3 ($p < 0,001$, respectievelijk $0,02 < p < 0,05$). Onderlinge vergelijking van de modellen 2 en 3 leidt niet tot een voorkeur voor één van beide modellen (tekentoets: $0,25 \leq p \leq 0,30$).

DISCUSSIE

De analyse van de dosis-respons curve in ELISA-IgG van de 26 onderzochte sera leverde een groot aantal gegevens op. Hoewel het aantal sera (26) relatief klein is, bevatte de groep wel een groot aantal sera met -naar verwachting- verschillende eigenschappen, zodat de resultaten toch representatief mogen worden geacht. Van de 32 oorspronkelijk onderzochte sera werden er 6 uitgesloten, omdat er te weinig bruikbare meetpunten waren.

Tabel 4.4. Negatieve sera: minimale kwadraatsommen voor de residuen ten aanzien van de drie modellen

Serum	Minimale kwadraatsommen x 10 ⁴			
	Aantal meetpunten	Model 1	Model 2	Model 3
1-5	7	18	42	29
1-7	8	33	40	47
1-8	7	18	28	49
2-3	7	90,3	107	90,2
2-5	6	1,1	1,8	0,8
2-6	6	15	20	17
2-8	7	11	29	18
3-2	7	20	622	105
3-5	7	1	49	67
4-2	6	27	81	37
4-4	6	41	58	47
4-5	6	25,44	25,99	25,97
4-6	7	37	46	54

Meetpunten, waarvan de extinctie weer opliep nadat van vorige meetpunten de extinctie -bij toenemende verdunning- daalde, werden van het onderzoek uitgesloten vanwege het vermoeden van een verdunningsfout in deze reeksen. Meetpunten met een extinctie <0,02 werden uitgesloten vanwege de onnauwkeurigheid van deze waarden. Weliswaar lagen in deze gevallen de niet-gecorrigeerde extincties (vóór aftrek van de gemiddelde extinctie van de antigeencontrole) meestal boven 0,1 en daarmee binnen het meetbereik, waarin de spectrophotometer nauwkeurig is, maar andere factoren in de test maken toch, dat zowel het resultaat van het te onderzoeken serum als dat van de antigeencontrole en dus a fortiori van hun verschil op dit niveau onnauwkeurig is. Mogelijk was er in dit onderzoek ook sprake van een systematische afwijking. Het is namelijk niet uitgesloten dat de waarde, die als "achtergrond"

extinctie werd afgetrokken, namelijk het gemiddelde van de anti-geencontrole onder aftrek van de hoogste en de laagste waarde, te hoog was. Dit zou bv. het geval kunnen zijn als de extincties van de antigeencontroles slechts in één richting -en wel naar boven- een fout kunnen tonen. Een dergelijke fout zou resulteren in te lage waarden van de gecorrigeerde extincties. Deze afwijking zou bij lage extincties relatief (ten opzichte van de ideale waarde) het grootst zijn. Dit zou een verklaring kunnen zijn voor het "afbuigen" van de curve bij lage extincties, waardoor model 2 daar niet goed "past". Om deze reden werd bij de verdere berekeningen in dit proefschrift de laagste waarde van de antigeencontroles niet meer weggelaten.

Een verklaring waarom sommige andere sera, bv. 3-2 een afwijkend verloop hebben, is niet goed te geven. Vermoedelijk zijn aspecifieke reacties hiervan de oorzaak. Om de -eventuele- kans hierop zoveel mogelijk te verkleinen, werd in latere proeven de samenstelling van de verdunningsvloeistof voor serum en conjugaat gewijzigd. Hieraan werd kweekmedium voor *M. pneumoniae* (zonder glucose en penicilline) in plaats van FCS toegevoegd. De veranderingen die hierdoor in de curve ontstaan, werden niet meer op bovengenoemde wijze statistisch onderzocht.

Bij de vergelijking van de verschillende modellen blijkt model 1 de beste aanpassing te geven. Het is echter een model met 4 parameters. Bovendien zijn de schattingen van deze parameters onnauwkeurig, doordat ze onderling afhankelijk zijn. Op grond hiervan meenden wij dat dit model niet praktisch bruikbaar zou zijn. Wel werd dit model in dit onderzoek gebruikt als referentie voor de andere modellen.

Vergelijking van de modellen 2 en 3 onderling op basis van de aanpassing, leidt, noch bij de positieve noch bij de negatieve sera, tot een voorkeur voor één van beide. Op grond van de nauwkeurige schatting van de parameter E in het tweede model en de goede overeenkomst van de waarde van E met het niveau van de curve, in overeenstemming met de theoretische verwachting (Bijlage I), gaat in principe de voorkeur uit naar model 2. Dit model is een expliciete vorm van een logit-log model, hetgeen aansluit bij modellen die voor radio-immunoassays worden gebruikt (Rodbard *et al.*, 1969).

In de praktijk bleek echter dat dit ingewikkelde 3-parameter-model vooralsnog niet tot een relatief eenvoudige algoritme voor gebruik in de mini-computer gereduceerd kon worden. Om deze reden werd een procedure ontwikkeld waarbij gebruik gemaakt werd van de goede aanpassing die ook model 3 geeft. Met behulp van de dosis-respons curve, die met model 3 kan worden berekend voor elk serum, dat in een verdunningsreeks in ELISA wordt onderzocht, werd een titer bepaald volgens een principe, dat gebaseerd is op de methode van de eindpunttitratie (zie 2.2.7., 2.2.8., 5.1., Bijlage II).

NADER ONDERZOEK VAN DE ELISA

In dit hoofdstuk worden een aantal onderzoeken met de ELISA voor *M. pneumoniae* beschreven, die verband houden met de berekening van de titer (5.1., 5.2.), met de specificiteit van de ELISA voor antistoffen tegen *M. pneumoniae* (5.3., 5.4. en 5.7.) en met de specificiteit voor de klasse antilichamen, die men wil aantonen (5.5. en 5.6.).

5.1. VASTSTELLING VAN DE GRENSSWAARDE VOOR BEREKENING VAN TITERS

In het vorige hoofdstuk zijn mathematische modellen onderzocht om de dosis-respons curve in ELISA te berekenen. In 2.2.7. en 2.2.8. wordt beschreven hoe men met behulp van één van deze modellen (model 3) een titer kan berekenen. De theoretische achtergronden van deze manier van berekenen van de titer -en van de hiervan afgeleide ELISA-eenheden (E.U.)- worden in Bijlage II uiteengezet. Voor een zo goed mogelijk onderscheid tussen negatieve sera (met uitsluitend aspecifieke reacties, Bijlage I.D.5.) en positieve sera (met specifieke -naast aspecifieke- reacties) is de keuze van de grenswaarde voor de berekening van titers van belang.

Op grond van de in Bijlage II genoemde theoretische overwegingen moet de grenswaarde zo gekozen worden, dat de extincties van de negatieve sera, ook in lage verdunningen, onder het niveau van de grenswaarde blijven. Als men over een groep sera beschikt, waarvan men zeker is dat ze negatief zijn, is de grenswaarde eenvoudig vast te stellen. In het algemeen kan men bij infectieziekten hiervoor gebruik maken van sera van jonge kinderen, die de infectie nog niet hebben doorgemaakt. Er zijn echter aanwijzingen dat *M. pneumoniae*-infecties al op jonge leeftijd -vaak al voor het eind van het eerste jaar- zonder herkenbare klinische symptomen voorkomen (Fernald *et al.*, 1975; Brunner *et al.*, 1977 ii). In verband hiermee is het dus niet goed mogelijk sera te selecte-

ren, die zeker geen antilichamen tegen *M. pneumoniae* bezitten.

Op grond van een aantal onderzoeken (o.a. 5.3.) bleek het dat de door ons samengestelde negatieve controlesera (2.7.1.) in feite "borderline sera" zijn, met extincties, die in de buurt van, of iets boven de grens tussen positieve en negatieve sera liggen. Op grond hiervan mag men verwachten dat de extinctie van deze sera in lage verdunning geschikt zal zijn als grenswaarde. Om de optimale verdunning te bepalen, onderzochten wij in telkens 8 assays voor ELISA-IgG en -IgM de negatieve en positieve controlesera (2.7.1.).

Aan de hand van de resultaten van deze proef kozen wij als grenswaarde een waarde, die gelijk was aan de extinctie van de negatieve controlesera (voor respectievelijk ELISA-IgG en -IgM) in een verdunning van 1:50. In de eerste plaats omdat de titers van de positieve controlesera bij deze grenswaarde goed reproduceerbaar bleken te zijn. Verder lagen de extincties van de negatieve sera in deze verdunning in het algemeen boven 0,1 dus binnen het optimale meetbereik van de spectrophotometer (voor IgG: 0,09 - 0,40; voor IgM: 0,11 - 0,26). Door de grenswaarde te definiëren als de extinctie van een controleserum in een bepaalde verdunning -in plaats van als een absolute extinctiewaarde- vindt correctie plaats voor toevallige verschillen in het niveau van de extincties in verschillende assays.

De zo gedefinieerde grenswaarde bleek door de meeste negatieve sera -volgens de berekening van de dosis-respons curve- niet of slechts in lage verdunning bereikt te worden (zie Hoofdstuk 9.2.4.) en voldoet dus aan de hierboven gestelde voorwaarde.

5.2. *EFFECT VAN REDUCTIE VAN HET AANTAL VERDUNNINGEN*

Voor onderzoek van grote aantallen sera in bv. een sero-epidemiologisch onderzoek is een zo eenvoudig mogelijke uitvoering van de ELISA gewenst. Op grond van de onderzoeken van Hoofdstuk 4 en van de experimenten die in paragraaf 5.6. zijn beschreven, is het duidelijk dat we voor de bepaling van een titer niet mochten uitgaan van de veronderstelling dat de dosis-respons curven parallel lopen. Omdat evenwijdigheid van de curven voorwaarde

is voor de bepaling van een titer aan de hand van één enkele serumverduunning (de Savigny en Voller, 1980), zagen we af van een methode die op één verdunning is gebaseerd. In plaats daarvan onderzochten wij of het -met behoud van de nauwkeurigheid- mogelijk was het aantal verdunningen te verminderen. Wij vergeleken hiertoe de resultaten van bepalingen in 4 viervoudige verdunningen (vanaf 1:25) met die in 8 tweevoudige verdunningen (vanaf 1:200 of 1:800).

Voor dit onderzoek werden 47 serumparen van patiënten met een titerstijging in de complementbindingsreactie (CBR) gebruikt (2.5.2.2.). In de proef met 4 verdunningen werden, zoals gewoonlijk, de negatieve controlesera (voor respectievelijk ELISA-IgG en -IgM) gebruikt als referentieserum voor de berekening van de titers. Als referentieserum in de proef met de tweevoudige verdunningen werd in ELISA-IgG het positieve controleserum (met 22 E.U.) en in ELISA-IgM het sterk positieve controleserum (met 67 E.U.) gebruikt (2.2.7.). Overigens was de ELISA-procedure in beide proeven gelijk (2.2.).

Fig. 5.1. (A en B) laat zien, dat er een zeer goede overeenkomst is tussen de twee proeven (de correlatie-coëfficiënt r^2 voor ELISA-IgM en -IgG bedraagt respectievelijk 0,91 en 0,87). Dit is opmerkelijk gezien de verschillen in uitvoering van de proeven. In de eerste plaats bedroeg de tussenpoos ongeveer een half jaar. Verder werden er verschillende batches van antigeen en conjugaten gebruikt, en verschillende referentiesera voor de berekening van de titer. Bovendien overlaptten de verdunningsreeksen elkaar nauwelijks. De resultaten in de proef met viervoudige verdunningsreeksen van sera met hoge titers (titer >1600 of >32 E.U.) werden berekend door extrapolatie van de dosis-respons curve; blijkens de goede overeenstemming van de resultaten in de beide proeven van juist deze sera (Fig. 5.1.) is dit een betrouwbare procedure. De resultaten van de sera met lage titers (titer <200 of <4 E.U.) werden in de proef met 8 tweevoudige verdunningen door extrapolatie berekend; van deze sera stemmen de resultaten van de beide proeven minder goed overeen.

Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt dat vermindering van het aantal verdunningen tot 4 (viervoudige) geoorloofd is.

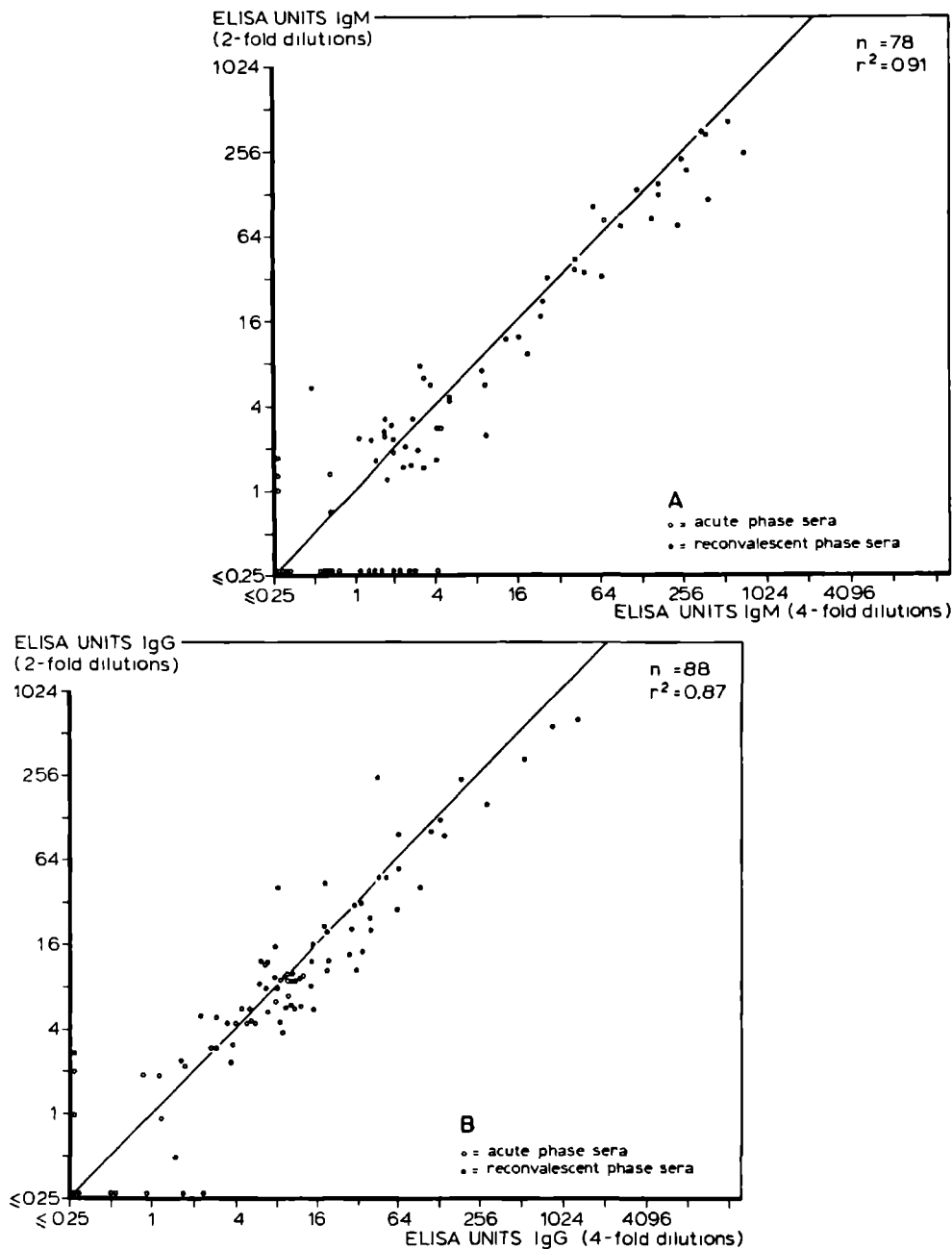


Fig. 5.1. Relatie tussen resultaten van proeven met 8 tweevoudige en 4 vier-voudige verdunningen

De uitkomsten in ELISA-IgM (A) en ELISA-IgG (B) van sera zijn weergegeven. De getrokken lijn is de lijn van equivalentie.

5.3. VERGELIJKING MET CONTROLE-ANTIGEEEN; GRENS TUSSEN SPECIFIEKE EN ASPECIFIEKE REACTIES

Om de grens tussen negatieve en positieve sera in ELISA te bepalen, wordt meestal een groep sera onderzocht, waarvan vaststaat dat zij negatief zijn. Op grond van de uitkomsten hiervan kan op verschillende manieren een bovengrens voor aspecifieke reacties worden vastgesteld (zie o.a. de Savigny en Voller, 1980). Zoals in paragraaf 1 van dit hoofdstuk is uiteengezet, is het niet eenvoudig een groep sera samen te stellen die negatief zijn voor antilichamen tegen *M. pneumoniae*. Om deze reden hebben wij getracht de grens op een andere manier vast te stellen, nl. door sera naast elkaar met *M. pneumoniae*- en controle-antigeen te onderzoeken en de resultaten te vergelijken. Voor deze methode leent het door ons gebruikte controle-antigeen van *M. pulmonis* (2.2.1.2.) zich goed. Het is een aan *M. pneumoniae* verwant organisme dat -zover bekend- niet pathogeen is voor de mens (wel voor knaagdieren; Cassell en Hill, 1979). Het controle-antigeen werd in hetzelfde medium en op dezelfde manier bereid als het *M. pneumoniae*-antigeen. Men mag dus aannemen dat de twee antigenen uitsluitend verschillen in de voor de betreffende micro-organismen specifieke, antigene componenten.

De methode om de grens tussen positieve en negatieve sera te bepalen, is gebaseerd op de volgende veronderstellingen. De extinctie bij gebruik van controle-antigeen berust op aspecifieke reacties (niet op specifieke antilichamen). Bij gebruik van *M. pneumoniae*-antigeen berust de extinctie eveneens op aspecifieke reacties, maar voor positieve sera, bovendien op reacties van specifieke antilichamen. De mate van aspecifieke reacties is in principe gelijk voor beide antigenen. Eventuele verschillen in de aspecifieke reacties zijn alleen het gevolg van verschillen in concentratie van de aspecifiek reagerende componenten van de antigenen. Op grond van deze veronderstellingen is het te verwachten dat voor sera zonder specifieke antilichamen -de negatieve sera- de verhouding van de extinctie met *M. pneumoniae*-antigeen tot de extinctie met controle-antigeen (de ratio) onafhankelijk is van de hoogte van die extincties. Voorts is het te verwachten, dat sera met specifieke antilichamen -de positieve sera- bij gebruik

van M. pneumoniae-antigeen een hogere extinctie zullen hebben, tengevolge van specifieke reacties, terwijl de extinctie met controle-antigeen niet verandert, zodat voor deze sera de ratio tussen beide groter is dan die voor negatieve sera. Volgens deze redenering moet de ratio voor positieve sera dus gecorreleerd zijn met de hoogte van de extinctie in ELISA voor M. pneumoniae. Omdat de hoogte van de extinctie bepalend is voor de waarde in E.U. van een serum, zal de ratio voor positieve sera ook gecorreleerd moeten zijn met het aantal E.U.

Om deze veronderstellingen te toetsen, onderzochten wij twee groepen sera, respectievelijk een groep sera van patiënten met serologisch aangetoonde M. pneumoniae-infectie (titerstijging in CBR) waarin sera met hoge ELISA-titers voorkwamen (Fig. 5.1., A en B), en een groep sera die negatief waren in de "metabolic inhibition test" (MIH) en waarin vermoedelijk vrij veel negatieve sera en sera met lage ELISA-titers voorkwamen. Het onderzoek van de eerste groep sera dat in de volgende paragraaf (5.4.) wordt besproken, leent zich vooral om de specificiteit van ELISA te toetsen. Het onderzoek van de tweede groep is vooral geschikt om inzicht te verkrijgen in de grens tussen negatieve en positieve sera. De laatste groep bestond uit 60 sera uit de serumgroepen 2.5.1.2. en 2.5.2.1., voorts het zwak positieve controleserum (2.7.1.1. en -in ELISA-IgG- het negatieve controleserum voor ELISA-IgG (2.7.1.2.)). Van deze sera werden in twee afzonderlijke proeven respectievelijk de ratio's in ELISA-IgG en -IgM bepaald (de verhouding tussen de extincties met M. pneumoniae-antigeen en M. pulmonis-antigeen, bepaald in een serumverdunding van 1:50) en het aantal E.U. IgG en IgM berekend (2.2.). De correlatie tussen ratio en E.U. werd onderzocht met behulp van de correlatietoets van Spearman.

In ELISA-IgG werd voor de hele groep van 60 sera een positieve correlatie tussen ratio en E.U. gevonden ($R = 0,36$, $n = 60$, $p < 0,01$). Bij onderzoek van een deel van deze sera bleek er voor sera met minder dan 0,7 E.U. IgG geen correlatie te bestaan ($R = 0,07$, $n = 39$, $p > 0,10$), maar wel voor de sera met minder dan 2 E.U. IgG ($R = 0,26$, $n = 53$, $p \approx 0,05$). Volgens bovenstaande redenering omvat de groep sera met minder dan 2 E.U. IgG dus sera met specifieke antilichamen en moet de grens tussen positief en

Tabel 5.1. Ratio's¹ van negatieve en zwak positieve sera in ELISA-IgG en -IgM voor M. pneumoniae

	n	E.U.	Ratio ¹		
		gem ²	gem ³	² log ³	SD ³
<u>ELISA-IgG</u>					
sera <0,7 E.U.	30	--	0,85	-0,23	0,37
neg. controle	1	1	1,18	0,24	--
pos. controle	1	2,25	2,06	1,04	--
<u>ELISA-IgM</u>					
sera <0,7 E.U.	16	--	1,22	0,28 ⁴	0,38
sera 0,7-1,3 E.U.	23	0,91	1,64	0,71 ⁴	0,47
zw. pos. controle	1	2,5	2,29	1,20	--

¹Verhouding tussen de extincties met respectievelijk M. pneumoniae en controle-antigeen

²Meetkundig gemiddelde

³Meetkundig gemiddelde van de ratio (gem); gemiddelde (²log) en standaardafwijking (SD) van de ²log van de ratio

⁴Significant verschil (p <0,001, Student's t-toets voor onafhankelijke steekproeven)

negatief dus onder 2 E.U. liggen. Ook de ratio's van de onderzochte controlesera wijzen op een grens tussen 1 en 2 E.U. IgG (Tabel 5.1.). De ratio van het negatieve controleserum is weliswaar hoger dan de gemiddelde ratio van de -zeker negatieve- sera met minder dan 0,7 E.U.; dit verschil is echter niet significant (p >0,10). De ratio van het zwak positieve controleserum -met 2,25 E.U. IgG- is wel significant verhoogd (p <0,001).

In ELISA-IgM bestond er voor de hele groep van 60 sera een zeer significante, positieve correlatie tussen ratio en E.U. (R = 0,66, n = 60, p <0,001). Correlatie-onderzoek op een deel van

de sera wijst op een grens tussen 0,7 en 1,0 E.U. (voor sera met <0,7 E.U.: $R = 0,34$, $n = 16$, $p > 0,10$; voor sera met <1,0 E.U.: $R = 0,52$, $n = 33$, $p < 0,01$). Dit is in overeenstemming met de bevinding, dat de gemiddelde ratio van sera met 0,7 - 1,3 E.U. hoger is dan die van sera met minder dan 0,7 E.U. (Tabel 5.1.). Opvallend is, dat de gemiddelde ratio van de als negatief te beschouwen sera in ELISA-IgM hoger is dan die in ELISA-IgG, terwijl de sera toch -afgezien van de gebruikte conjugaten- op dezelfde wijze en parallel in ELISA-IgG en -IgM werden onderzocht. Tabel 5.1. laat bovendien zien dat -volgens bovenstaande redenering- meer sera positief zijn voor IgM- dan voor IgG-antilichamen. Op dit verschijnsel wordt in Hoofdstuk 10 nader ingegaan.

Samenvattend vonden we in dit onderzoek aanwijzingen dat de grens tussen positieve en negatieve sera voor ELISA-IgG ongeveer bij 1 à 2 E.U. ligt en voor ELISA-IgM bij 0,7 à 1 E.U.

5.4. VERGELIJKING MET CONTROLE-ANTIGEEEN; CORRELATIE-ONDERZOEK VAN POSITIEVE SERA

De in paragraaf 5.2. beschreven serumparen van patiënten met een titerstijging in de CBR werden naast elkaar in ELISA-IgG en -IgM met zowel *M. pneumoniae*- als controle-antigeen onderzocht, en wel in een serumverduunning van 1:800. De ratio (de verhouding tussen de extinctie met respectievelijk *M. pneumoniae*- en controle-antigeen) werd vervolgens vergeleken met de waarde in E.U. van deze sera. De correlatie tussen beide werd onderzocht.

Voor ELISA-IgM bedroeg de correlatie-coëfficiënt r^2 0,61, voor ELISA-IgG 0,66 (Pearson's correlatie). Deze goede correlatie wijst er op, dat de ELISA voor *M. pneumoniae* specifiek is (zie de inleiding van de vorige paragraaf). Op grond van dit en het vorige (5.3.) onderzoek besloten wij om -ter vereenvoudiging van de procedure- in de verdere proeven het controle-antigeen weg te laten.

5.5. ONDERZOEK NAAR DE KLASSE-SPECIFICITEIT VAN ELISA-IgG EN -IgM

De specificiteit van de ELISA ten aanzien van de klasse antilichamen (IgG of IgM) werd onderzocht met behulp van sucrose-gradiënt-fracties van twee sera (2.6.). Serum A was een patiëntens serum, dat sterk positief was in alle serologische reacties voor *M. pneumoniae*, met 215 E.U. IgG en 220 E.U. IgM. Serum B was serum van een gezonde persoon met 26 E.U. IgG en 2,5 E.U. IgM. De fracties werden in één verdunning (1:20) in duplo in ELISA-IgG en -IgM onderzocht. Bovendien werden de fracties in tweevoudige verdunningsreeksen vanaf 1:4 in de indirecte haemagglutinatietest (IHA) onderzocht.

De resultaten zijn weergegeven in Fig. 5.2. Er was een goede scheiding van IgG en IgM. Uit de figuren blijkt dat de ELISA-IgG en -IgM specifiek zijn voor de onderzochte klassen antilichamen. In een deel van de IgG-fracties van serum A is enige IgM-activiteit; dit zou kunnen berusten op de aanwezigheid van 7-S-IgM (monomeer). Opvallend is het kleine topje in de IgM-fractie van serum B; dit pleit ervoor dat de zwak positieve reactie van dit serum in de ELISA-IgM inderdaad op specifieke IgM-antistoffen tegen *M. pneumoniae* berust.

De IHA was voor serum B in alle fracties negatief. Het onderzoek van serum A laat zien, dat de hoogte van de titers in de IHA nauw parallel loopt aan de activiteit in de ELISA-IgM. De IHA lijkt dus specifiek IgM aan te tonen. Hierop wordt nader ingegaan in Hoofdstuk 6 en 8.

5.6. COMPETITIE TUSSEN IgM- EN IgG-ANTILICHAMEN

De dosis-respons curve in ELISA kan in principe -ten gevolge van competitie- beïnvloed worden door specifieke antilichamen van andere klassen dan die men wil onderzoeken. Op theoretische gronden valt het te verwachten, dat ten gevolge van competitie de dosis-respons curve lager zal komen te liggen, vooral bij de lagere verdunningen (zie Bijlage I.D.4). Vooral IgG- en IgM-antilichamen zouden een dergelijk effect kunnen veroorzaken, omdat deze antilichamen in serum in de grootste hoeveelheid voorkomen.

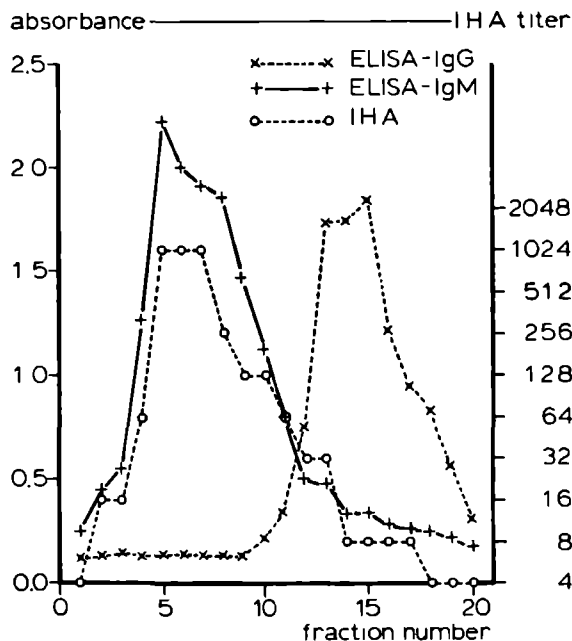


Fig. 5.2.A. Onderzoek van serumfracties in ELISA-IgG en -IgM en IHA
 Sucrose-gradiënt-fracties van een sterk positief serum (A).

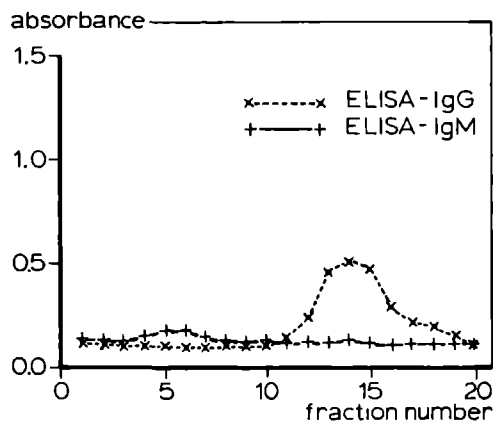


Fig. 5.2.B. Onderzoek van serumfracties in ELISA-IgG en -IgM en IHA
 Sucrose-gradiënt-fracties van zwak positief serum (B). De titer in de IHA was
 voor alle fracties kleiner dan 4.

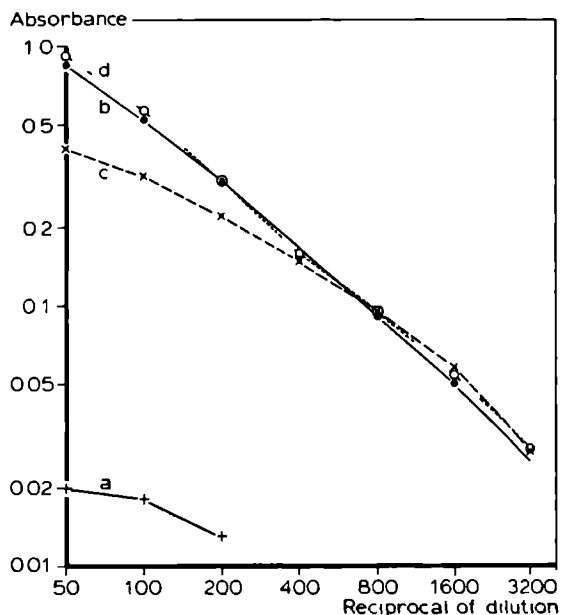
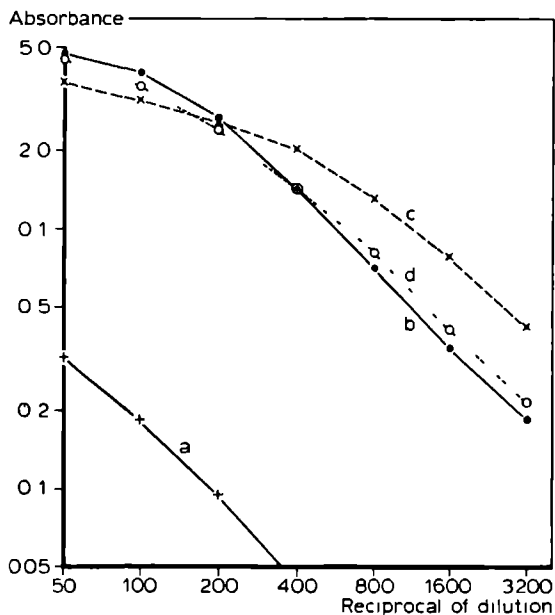


Fig. 5.3.A. ELISA-IgG: effect van competitie door specifiek IgM

IgG-fracties van een sterk positief serum (A) werden getitreerd, na -in een verhouding 1:25- gemengd te zijn met sucrose (b), de IgM-fractie van serum A (c) en de IgM-fractie van een zwak positief serum B (d). Als controle werd de IgM-fractie van serum A onderzocht (a).

Fig. 5.3.B. ELISA-IgM: effect van competitie door specifiek IgG

IgM-fracties van een sterk positief serum (A) werden getitreerd, na -in een verhouding 1:25- gemengd te zijn met sucrose (b), de IgG-fractie van serum A (c) en de IgG-fractie van een zwak positief serum B (d). Als controle werd de IgG-fractie van serum A onderzocht (a).



Om het effect van competitie te bestuderen, werden IgG- en IgM-fracties van twee sera in verschillende verhoudingen bij elkaar gevoegd en vervolgens in een ELISA-IgG en in een ELISA-IgM onderzocht. Wij gebruikten de fracties 6 (IgM-fractie) en 16 (IgG-fractie) van de sera A en B die in de vorige paragraaf werden beschreven. Voor onderzoek in ELISA-IgM werd de IgM-fractie van serum A in een verhouding van 1:25 gemengd met de IgG-fractie van serum A en bovendien -afzonderlijk- met de IgG-fractie van serum B. Voor onderzoek in ELISA-IgG werd de IgG-fractie van serum A in een verhouding van 1:25 gemengd met de IgM-fracties van serum A en B. De mengsels werden in tweevoudige verdunningsreeksen (1:25 - 1:3200) in duplo onderzocht. Als positieve en negatieve referentie werden de IgM- en IgG-fracties van serum A (het sterk positieve serum), 1:25 verdund in 20% sucrose-oplossing, zowel in ELISA-IgG als ELISA-IgM onderzocht, ook weer in een tweevoudige verdunningsreeks in duplo.

De extincties van de 1:25 verdunde referentie-fracties waren lager dan men op grond van het verloop van de dosis-respons curve bij de overige verdunningen zou verwachten. In deze verdunning was de gebruikelijke verdunningsvloeistof (met medium III) niet aanwezig. Daarom werden de resultaten van de proeven met de referentie-fracties en met de mengsels van IgM- en IgG-fracties in deze verdunning (1:25) buiten beschouwing gelaten.

Figuur 5.3. laat de resultaten zien van dit onderzoek. In ELISA-IgG blijkt de competitie van IgM-antilichamen van serum A tot de theoretisch verwachte daling van de dosis-respons curve van de IgG-fractie van serum A te leiden (curve c in Fig. 5.3.A.), vooral in lagere verdunningen. In ELISA-IgM blijken de extincties van de IgM-fractie van serum A door de aanwezigheid van de IgG-fractie van serum A in de hoge verdunningen verhoogd te worden (curve c in Fig. 5.3.B.). Deze hogere extinctie kan worden verklaard uit de aanwezigheid van IgM-antilichamen in de IgG-fractie van serum A, zoals in de vorige paragraaf werd gevonden, en zoals ook het verloop van de curve van de IgM-fractie van serum A in de ELISA-IgM (curve a in Fig. 5.3.B.) laat zien. Indien men hiermee rekening houdt, is gemakkelijk te zien dat de extincties in lage verdunningen relatief verlaagd zijn (de extincties zijn dan zelfs lager dan die van de niet gemengde IgM-fractie).

De resultaten van dit onderzoek zijn dus in overeenstemming met de verwachting dat door competitie door antilichamen van een andere klasse een afwijking van de dosis-respons curve zal ontstaan, in die zin dat in lagere verdunningen (hoge concentraties) verlaging van de extinctie zal optreden.

Het effect hiervan is in ons systeem gering en levert in de praktijk geen problemen op, omdat de titer bij lage extincties (overeenkomend met lage concentraties antilichamen) wordt bepaald. Zo waren zelfs in de IgG-fractie van serum A (curve a in Fig. 5.3.B.) waarin zich slechts weinig specifiek IgM en een overmaat IgG-antilichamen bevonden, de IgM-antilichamen duidelijk aantoonbaar. In lage verdunningen (hoge concentraties) zal competitie wel een duidelijk effect hebben; de curven met en zonder competitieve antilichamen zullen in dit gebied niet evenwijdig lopen. Dit is vooral van belang indien men een titer aan de hand van één serumverdunding bepaalt, omdat men dan uitgaat van de vooronderstelling dat de curven evenwijdig lopen (van Loon en van der Veen, 1980; de Savigny en Voller, 1980). Omdat competitie vooral van betekenis zal zijn voor sera met hoge concentraties antilichamen, die dus duidelijk positief zijn, is de praktische betekenis hiervan dubieus. Toch verdient onzes inziens, op grond van dit onderzoek, een titratie aan de hand van meer verdunningen de voorkeur boven bepaling van de titer op basis van een enkele serumverdunding.

5.7. *ORIENTEREND ONDERZOEK NAAR DE INVLOED VAN RHEUMA-FACTOR*

Rheuma-factor (IgM-anti-IgG) kan de resultaten van een indirecte ELISA voor IgM-antilichamen beïnvloeden. Als een patiëntenserum specifiek IgG gevat, worden de IgG-antilichamen -evenals de IgM-antilichamen- aan het bijbehorende antigeen gebonden. Bevat het serum ook nog rheuma-factor, dan wordt de rheuma-factor aan het complex van antigeen en IgG-antilichamen gebonden. Dit wordt vervolgens door het hierna toegevoegde anti-IgM conjugaat aangetoond. Om een indruk te krijgen van de problemen die dit in de praktijk voor de diagnostiek van *M. pneumoniae*-infecties door middel van ELISA-IgM zou kunnen opleveren, werden 30 sera onder-

Tabel 5.2. Verband tussen rheuma-factor en ELISA-IgM voor *M. pneumoniae*

Onderzoek van 30 sera, ingezonden voor onderzoek op rheuma-factor.

Latex fixatie, titer	Aantal sera	ELISA-IgM	
		Pos. ¹	E.U. ²
<10	12	1	1,8
10 - 40	9	3 ³	1,7 - 2,4
>80	9	4	3,4 - 5,7
Totaal	30	8	-

¹Aantal positieve sera (met >1 E.U. IgM)²Spreiding in uitkomsten in ELISA-IgM van de positieve sera³Niet inbegrepen één serum met 7,9 E.U. IgM en 46 E.U. IgG (mogelijk afkomstig van patiënt met recente infectie)

zocht in ELISA-IgG en -IgM, die waren ingestuurd voor onderzoek op rheuma-factor (afdeling Bacteriologie, hoofd: Prof. Dr. G.C.J. van der Ploeg, van het Instituut voor Medische Microbiologie).

De resultaten van dit onderzoek zijn samengevat in Tabel 5.2. Van de sera met een positieve latex-fixatietest (titer >10) was een groter aantal positief in ELISA-IgM (1 E.U. IgM) dan van de sera met een negatieve latex-fixatietest. Het verschil was juist significant ($p \approx 0,05$, χ^2 -toets). Het is dus aannemelijk dat IgM-rheumafactor in de ELISA-IgM voor *M. pneumoniae* fout-positieve reacties kan veroorzaken. De door ons onderzochte sera hadden echter lage ELISA-IgM waarden, zodat het weinig waarschijnlijk is, dat rheuma-factor een probleem zal zijn voor de diagnostiek van *M. pneumoniae*-infecties, omdat -zoals we in Hoofdstuk 8 en 9 zullen zien- alleen aan hogere waarden (8-16 E.U. IgM en hoger) diagnostische betekenis gehecht mag worden.

VERGELIJKING VAN DE ELISA MET BESTAANDE SEROLOGISCHE METHODEN

Om een indruk te krijgen van de gevoeligheid en de specificiteit van de ELISA-IgG en -IgM voor het aantonen van antilichamen tegen *M. pneumoniae*, vergeleken wij de resultaten van deze assays met de uitkomsten van enkele bestaande serologische onderzoeksmethoden, en wel de complementbindingsreactie (CBR), de metabolic inhibition test (MIH) en de indirecte haemagglutinatietest (IHA).

Wij onderzochten 2 groepen sera. Groep 1 bestond uit serumparen van 47 patiënten met een titerstijging in de CBR (2.5.2.2.). De eerste sera van deze serumparen waren, op 4 gevallen na, binnen 3 weken na het begin van de ziekte afgenomen. Groep 2 bestond uit serumparen, die negatief waren in de CBR (2.5.2.1.). Van deze groep werden alleen de tweede sera onderzocht.

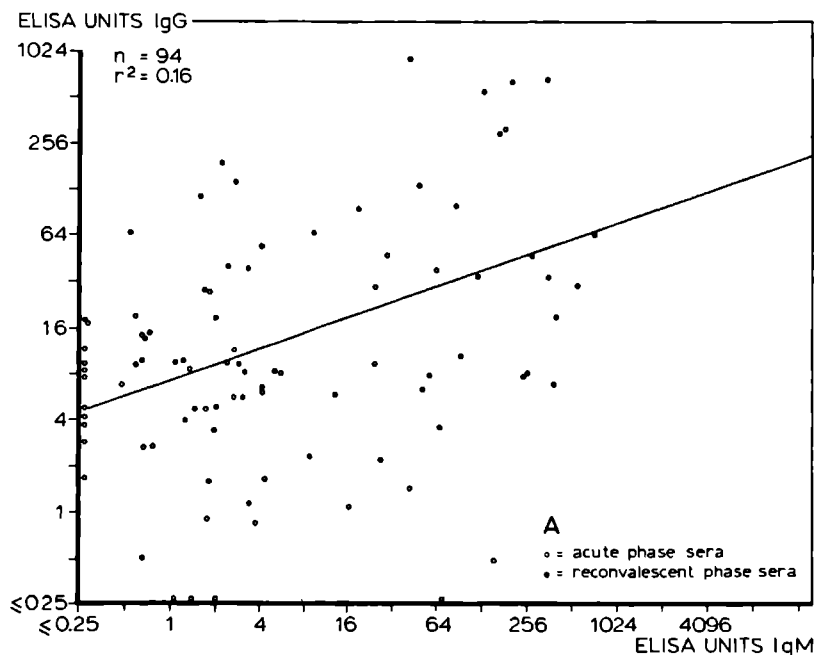
De ELISA-procedure werd, zoals gebruikelijk, uitgevoerd in 4 viervoudige verdunningen (2.2.). De procedure voor CBR, MIH en IHA is beschreven in 2.3. Twee verschillende methoden werden telkens met elkaar vergeleken door middel van een correlatie-onderzoek. De correlatie-coëfficiënt r^2 werd -volgens de methode van de kleinste kwadraten- berekend voor de logarithmen van de uitkomsten, voorzover die in beide onderzochte methoden een meetbare uitkomst opleverde. Als meetbare uitkomsten werden titers van ≥ 4 in de CBR, van ≥ 2 in MIH en van ≥ 10 in IHA beschouwd, en in ELISA een resultaat van tenminste 0,25 E.U.

Als eerste werden *ELISA-IgG* en *ELISA-IgM* met elkaar vergeleken. De resultaten van de sera van groep 1 zijn weergegeven in Fig. 6.1., A en B. Er blijkt een geringe (wel significante) correlatie te bestaan tussen de hoeveelheid met ELISA aangetoonde IgM- en IgG-antilichamen. Titerstijgingen (tenminste tweevoudig) gingen vaak met elkaar samen, zoals Tabel 6.1. laat zien. De resultaten van de sera van groep 2 zijn weergegeven in Fig. 6.1.B.

Vervolgens werd onderzoek gedaan naar het verband tussen de uitkomsten van ELISA-IgM en -IgG en de *leeftijd*. Voor dit onderzoek werden de sera van groep 1 gebruikt. De resultaten zijn weer-

Fig. 6.1.A. Vergelijking van ELISA-IgG met ELISA-IgM

De regressielijn is weergegeven door de getrokken lijn. Onderzoek van serumparen van 47 patiënten met titerstijging in de CBR.



Tabel 6.1. Associatietabel van titerstijgingen (tenminste tweevoudig) in ELISA-IgG en -IgM van serumparen van patiënten met een titerstijging in de CBR

Titerstijging in ELISA-IgG	Titerstijging in ELISA-IgM		Totaal
	+	-	
+	28	11	39
-	3	5	8
Totaal	31	16	47

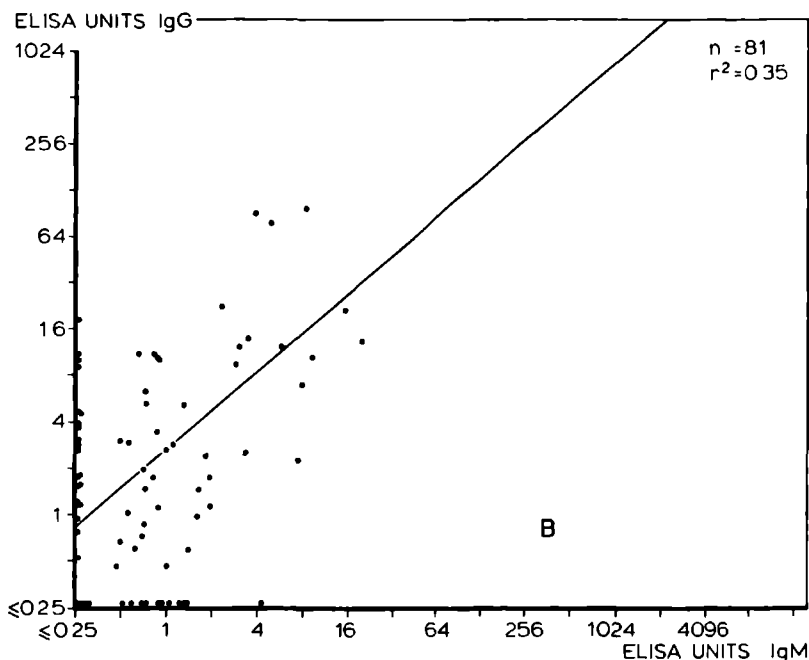


Fig. 6.1.B. Vergelijking van ELISA-IgG met ELISA-IgM

De regressielijn is weergegeven door de getrokken lijn. Onderzoek van 81 sera die negatief waren in de CBR.

gegeven in Fig. 6.2., A en B. Bij patiënten onder 40 jaar werden -tijdens de reconvalescentie- meer IgM-antilichamen aangetroffen dan bij oudere patiënten. Voor IgG-antilichamen was dit verschil niet zo duidelijk.

Fig. 6.3.A., die betrekking heeft op onderzoek met sera van groep 1, laat zien dat er een opvallend goede correlatie bestaat tussen de uitkomsten van ELISA-IgM en CBR. De uitkomsten van ELISA-IgG en CBR zijn minder goed gecorreleerd (Fig. 6.3.B.). Uit Fig. 6.1.A. en B., blijkt dat sera van groep 2 -die negatieve reacties hadden in de CBR- in het algemeen negatief of zwak positief waren in ELISA-IgM en ELISA-IgG. Slechts zes sera van deze groep hadden waarden van 16 E.U. of hoger in ELISA-IgG, en één serum had een waarde van ruim 16 E.U. in ELISA-IgM.

Fig. 6.4.A., die betrekking heeft op onderzoek met sera van

groep 1, laat een matig sterke correlatie tussen ELISA-IgM en *metabolic inhibition test* (MIH) zien. Er is echter een opvallend goede correlatie tussen MIH en ELISA-IgG (Fig. 6.4.B.). Hiermee in overeenstemming is, dat van de 30 serumparen in groep 1, die in de MIH een tenminste 4-voudige titerstijging hadden, er 29 in ELISA-IgG en 26 in ELISA-IgM een titerstijging hadden (25 in beide ELISA's). Ook in groep 2 was er een goede correlatie tussen de resultaten in MIH en ELISA-IgG (Tabel 6.2.). Daarentegen werd er in deze groep geen correlatie tussen resultaten in ELISA-IgM en MIH gevonden.

Fig. 6.5., A en B, laat de correlatie tussen de resultaten in de *indirecte haemagglutinatie*test (IHA) en ELISA van de sera van groep 1 zien. De correlatie tussen ELISA-IgG en IHA is gering; die tussen IHA en ELISA-IgM opvallend goed. Alle sera (33) die een spiegel van meer dan 16 E.U. IgM hadden, waren ook in de IHA positief (met een titer van tenminste 40). Sera die een lagere spiegel dan 16 E.U. hadden in ELISA-IgM (55), waren met uitzondering van 7 sera, ook negatief in de IHA (titer van 10 of lager). De laatstgenoemde 7 sera waren eerste sera van serumparen van patiënten met een duidelijke titerstijging in IgM-antilichamen; ze waren zwak positief in ELISA-IgM (1 serum had een spiegel van 1 E.U., de overige 6 van 2-4 E.U. IgM-antilichamen). Alle 23 patiënten met een tenminste 4-voudige titerstijging in de IHA toonden ook een titerstijging in de ELISA-IgG, 21 eveneens in ELISA-IgM.

Tabel 6.2. Associatietabel van de resultaten van ELISA-IgG en MIH van sera met een titer van <4 in de CBR

MIH titer	ELISA-IgG		Totaal
	>1 E.U.	≤1 E.U.	
≥2	46	14	60
<2	7	15	22
Totaal	53	29	82

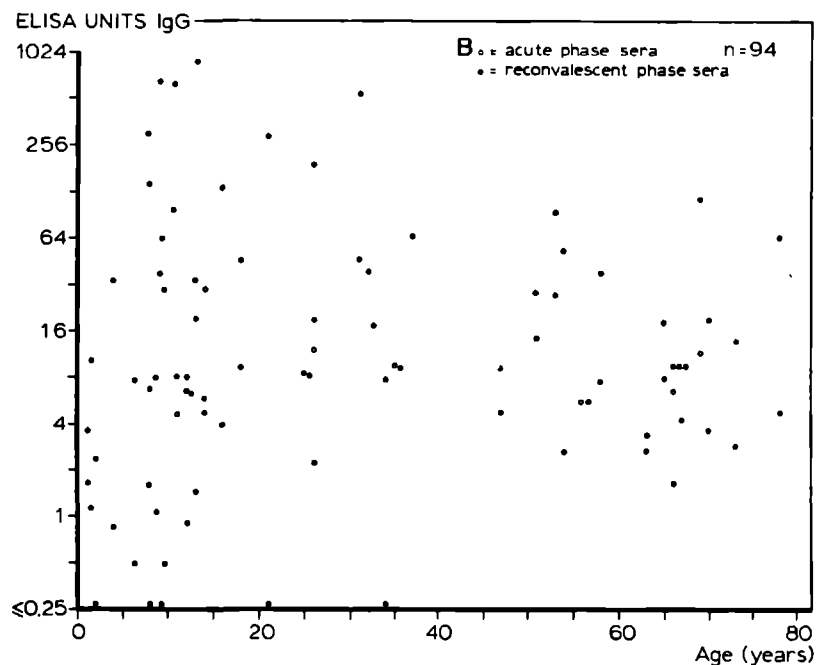
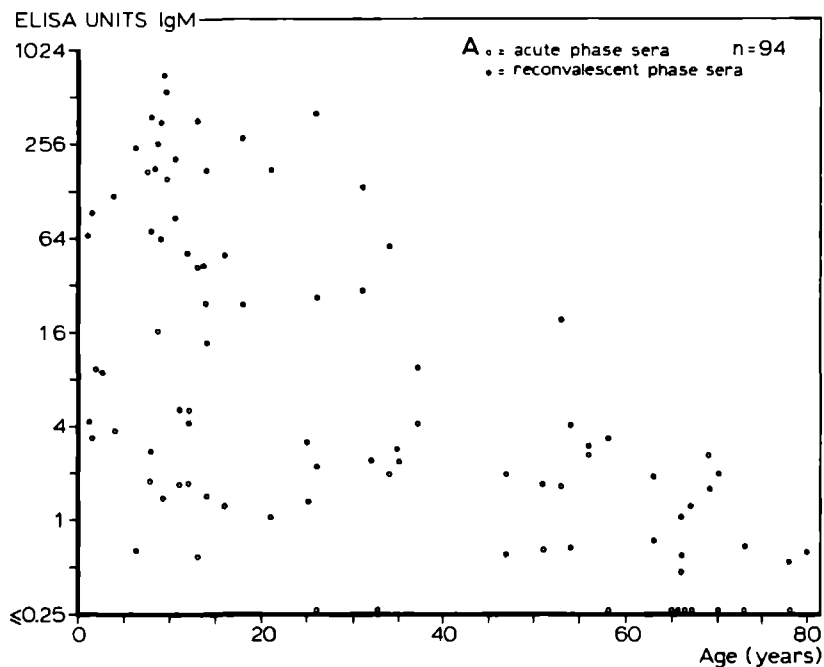


Fig. 6.2. Verdeling van IgM-antistoftiters (A) en IgG-antistoftiters (B) naar leeftijd

Onderzoek van serumparen van 47 patiënten met titerstijging in de CBR.

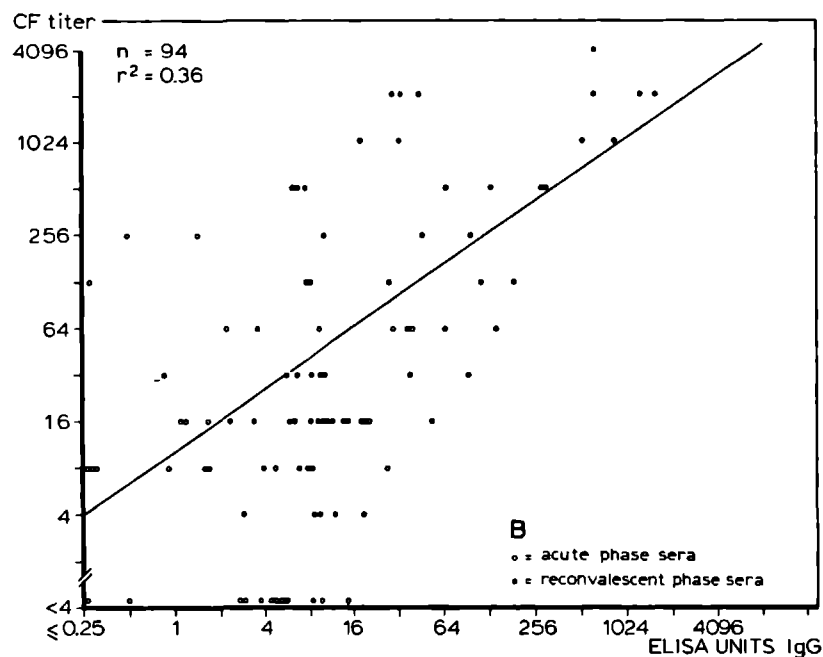
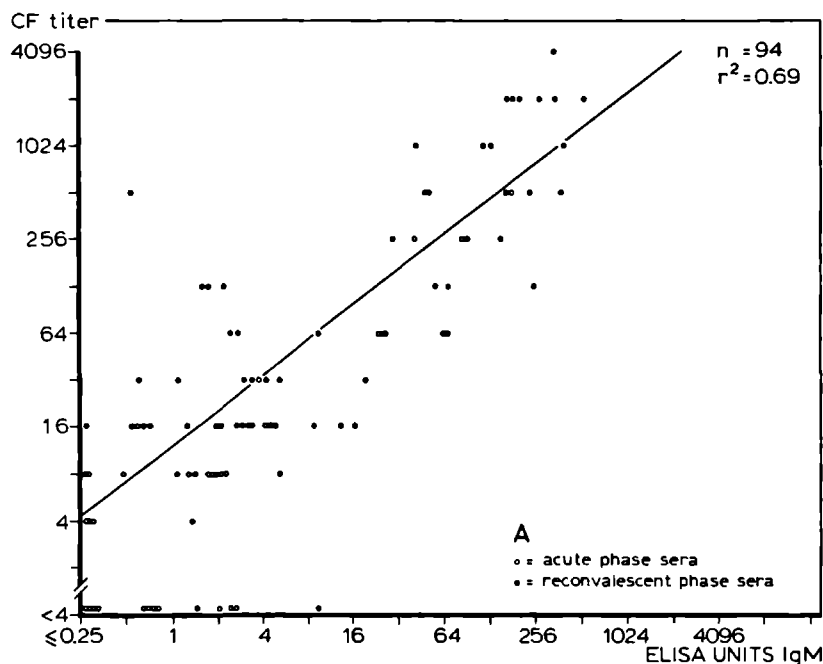


Fig. 6.3. Vergelijking van ELISA-IgM (A) en ELISA-IgG (B) met de CBR
Onderzoek van serumparen van 47 patiënten met titerstijging in de CBR. De regressielijn is weergegeven door de getrokken lijn.

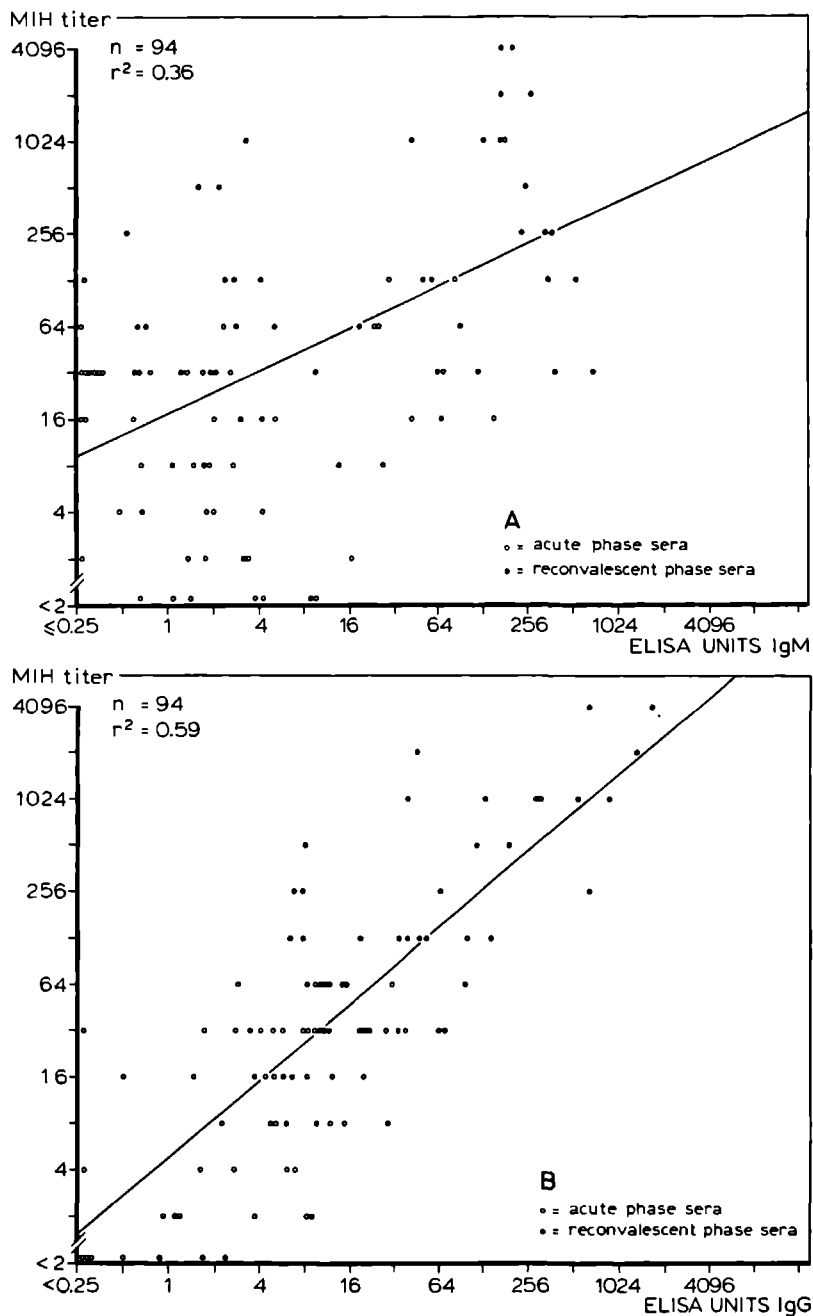


Fig. 6.4. Vergelijking van ELISA-IgM (A) en ELISA-IgG (B) met MIH
Onderzoek van serumparen van 47 patiënten met titerstijging in de CBR. De regressielijn is weergegeven door de getrokken lijn.

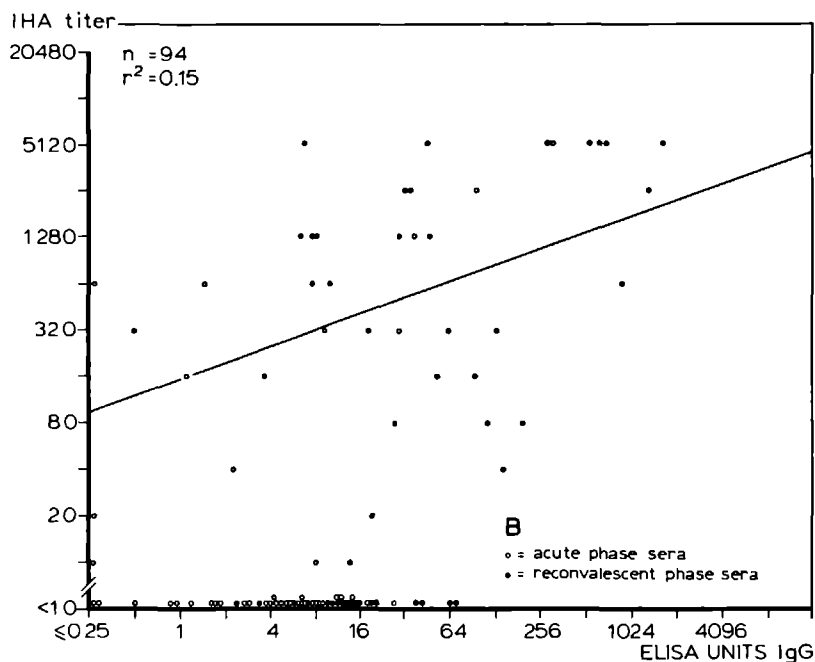
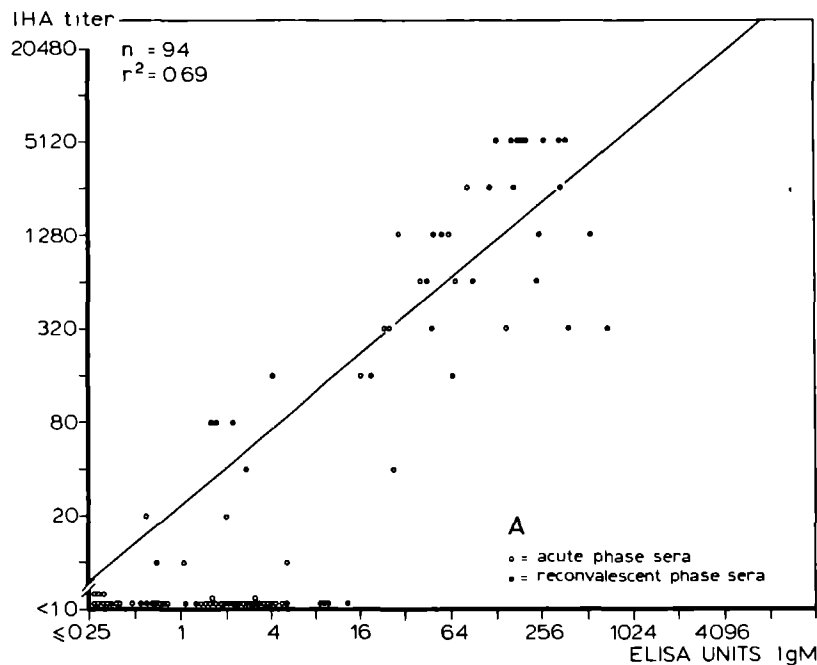


Fig. 6.5. Vergelijking van ELISA-IgM (A) en ELISA-IgG (B) met IHA

Onderzoek van serumparen van 47 patiënten met titerstijging in de CBR. De regressielijn is weergegeven door de getrokken lijn.

Geen van de sera van groep 2 was positief in de IHA. Eén serum toonde weliswaar een reactie in de IHA in een verdunning van 1:10, maar deze uitslag mag niet als positief worden beschouwd.

Omdat een goede correlatie werd gevonden tussen de resultaten van ELISA-IgM en IHA ontstond het vermoeden dat de IHA uitsluitend gevoelig was voor IgM-antilichamen. Dit vermoeden werd gesteund door het onderzoek van serumfracties, dat in Hoofdstuk 5 (Fig. 5.2.A. en B.) werd beschreven. Om uit te sluiten dat IgG-antilichamen invloed hadden op de titer in de IHA voerden wij een partieel correlatie-onderzoek uit. De sera van groep 1 werden, naar het aantal E.U. IgM-antilichamen, ingedeeld in subgroepen, respectievelijk met <2 E.U. en met 2-16, 16-128 en ≥128 E.U. Van de 55 sera met minder dan 2 en met 2-16 E.U. IgM-antilichamen waren er slechts 7 positief in IHA (deze sera zijn reeds boven genoemd). Het was opvallend dat 6 van deze sera hoge titers van IgG-antistoffen hadden (>25 E.U.); deze titers hoorden tot de hoogste in deze 2 subgroepen.

In de subgroep met 16-128 E.U. IgM-antilichamen was er geen significante correlatie tussen de resultaten in ELISA-IgG en in de IHA ($n = 17$, $R = 0,29$, $p > 0,10$). In de subgroep met meer dan 128 E.U. IgM-antilichamen was er wel een significante correlatie tussen de twee reacties ($n = 16$, $R = 0,65$, $p \approx 0,01$; Spearman's correlatietoets). De hypothese dat IgG-antistoffen geen invloed hebben op de hoogte van de titer in de IHA moet dus worden verworpen.

DISCUSSIE

De vergelijking van ELISA-IgG en -IgM met de bestaande serologische onderzoeksmethoden wordt bemoeilijkt, doordat deze laatste zowel IgG- als IgM-antilichamen kunnen aantonen. Omdat de resultaten van ELISA-IgM slechts in geringe mate met die van ELISA-IgG waren gecorreleerd ($r^2 = 0,16$), zoals bleek uit het onderzoek van de sera van groep 1, was het mogelijk om de beide assays afzonderlijk met de bestaande methoden te vergelijken. De geringe correlatie hangt -mag men aannemen- samen met een verschillend patroon van vorming en afbraak van IgG- en IgM-antilichamen in

het verloop van een infectie.

Het onderzoek naar de samenhang tussen IgM-antilichamen en de leeftijd werd verricht, omdat Biberfeld (1971 i) en Skaug *et al.* (1976) bij patiënten op jongere leeftijd hogere spiegels van IgM-antilichamen vonden dan op oudere leeftijd. Van de patiënten van groep 1 (met een significante titerstijging in de CBR) hadden 20 van de 31 patiënten, jonger dan 40 jaar, een spiegel van 16 E.U. IgM-antilichamen of meer; dit was slechts bij 2 van de 16 patiënten boven 40 jaar het geval. Onze resultaten stemmen dus overeen met die van de genoemde auteurs.

Vergelijkt men de uitkomsten van ELISA-IgG en -IgM met die van de CBR, dan blijkt er in de eerste groep sera (patiënten met een significante titerstijging in de CBR) een goede correlatie te bestaan tussen ELISA-IgM en CBR ($r^2 = 0,69$) en een minder goede, maar wel significante correlatie tussen ELISA-IgG en CBR ($r^2 = 0,36$). Bij 5 patiënten -met een hoogste titer in de CBR van 32- werd noch in ELISA-IgM, noch in ELISA-IgG een titerstijging gevonden. Dit zou kunnen wijzen op een geringere gevoeligheid van de ELISA. Men mag echter, vanwege de selectie van patiëntensera op grond van de resultaten in de complementbindingsreactie, de gevoeligheid van ELISA uiteraard niet vergelijken met die van de CBR; wel met die van MIH en IHA. Wat de MIH betreft, blijkt de correlatie tussen deze methode en ELISA-IgM in de eerste groep gering te zijn ($r^2 = 0,36$). De correlatie met ELISA-IgG is beter ($r^2 = 0,59$). Dit wijst er op dat de MIH, zoals door ons uitgevoerd, vooral IgG-antilichamen aantoont. In de tweede groep sera (de sera die negatief waren in de CBR), werd geen correlatie tussen MIH en ELISA-IgM gevonden. Wel was er weer een goede overeenkomst tussen de resultaten in MIH en ELISA-IgG. Er waren echter 16 sera die positief waren in MIH, maar negatief in ELISA-IgG. Het is mogelijk dat dit werd veroorzaakt door een fout-positieve reactie in de MIH ten gevolge van groeiremmende antibiotica in de sera (Smith en Hermann, 1971). Door de omstandigheid dat antibiotische therapie de uitkomsten van de MIH kan beïnvloeden, is het moeilijk een goedgefundeerd oordeel te geven over de gevoeligheid van ELISA in vergelijking met MIH.

De uitkomsten van de IHA stemmen goed overeen met de resultaten van de ELISA voor IgM-antilichamen. De laatste reactie was ge-

voeliger dan de eerste. Biberfeld (1968) heeft er reeds op gewezen dat de IHA vooral IgM-antilichamen aantoonst. Zij vond echter in IgG-fracties van enkele reconvalescentensera een positieve IHA-reactie. Ook onze resultaten wijzen er op dat de IHA enigszins gevoelig is voor IgG-antilichamen. Desondanks is het verband tussen een positieve IHA-reactie en aanwezigheid van IgM-antilichamen zo groot, dat de IHA mogelijk gebruikt kan worden voor het aantonen van de relatief vroeg tijdens infecties gevormde IgM-antilichamen en zo voor de "snelle" diagnostiek van *M. pneumoniae*. Onderzoek naar deze mogelijkheid wordt in Hoofdstuk 8 beschreven.

CONCLUSIE

De resultaten van ELISA-IgM stemmen goed overeen met die van de CBR en IHA. De resultaten van ELISA-IgG komen goed overeen met die van de MIH. Deze bevindingen ondersteunen de veronderstelling dat met de ELISA voor *M. pneumoniae* specifieke antistoffen tegen *M. pneumoniae* worden aangetoond.

SEROLOGISCH ONDERZOEK EN KweekPROEVEN BIJ PATIËNTEN

In dit hoofdstuk beschrijven wij de uitkomsten van onderzoeken bij 20 patiënten (2.5.3.), bij wie naast serologisch onderzoek ook kweekproeven op *M. pneumoniae* waren verricht en van 1 patiënt met röntgenologisch bevestigde pneumonie (no. 1) van wie vóór en na het begin van de ziekte herhaalde malen bloed was afgenomen, maar geen keeluitstrijk.

Het doel van dit onderzoek was in de eerste plaats om inzicht te krijgen in het verloop van de antistofspiegels tijdens een infectie met *M. pneumoniae* en daarnaast om een indruk te krijgen van de problemen die zich bij de diagnostiek met behulp van ELISA kunnen voordoen.

Dertien patiënten waren in het ziekenhuis (St. Radboudziekenhuis of kinderafdeling van het Canisius-Wilhelminaziekenhuis) opgenomen. Acht waren pupillen van het tehuis voor geestelijk gehandicapte jongeren "De Binckhorst" te Rosmalen. Bij hen werd onderzoek verricht omdat in het tehuis een epidemietje van ernstige luchtweginfecties voorkwam. Door de consulterend kinderarts, Dr. C.J. van Oostrom, was de vermoedelijke diagnose *M. pneumoniae*-pneumonie gesteld. In samenwerking met de arts van het tehuis, mevrouw A.C.M. Akkermans-Scholten, werd -tegen het einde van de epidemie- materiaal voor onderzoek afgenomen bij 2 patiënten, die minder dan 2 weken tevoren geïnfecteerd waren, bij 3 patiënten die 5-12 weken tevoren waren geïnfecteerd met verschijnselen van pneumonie en bij een aantal pupillen zonder ziekteverschijnselen die direct contact hadden gehad met de patiënten. Bij drie van de onderzochte contactpersonen was *M. pneumoniae* geïsoleerd; van hen (no. 19, 20 en 21) wordt de uitkomst van de kweekproef en het serologisch onderzoek hier beschreven, niet van de andere onderzochte contactpersonen, bij wie het onderzoek negatief was.

In Tabel 7.1. zijn de bevindingen bij 10 patiënten bij wie de diagnose, *M. pneumoniae*-pneumonie, vaststond op grond van het klinische beeld in combinatie met een positieve kweekproef (9 van de 10 gevallen) of een titerstijging in de CBR (1 geval) weergegeven. Bij alle 9 patiënten bij wie *M. pneumoniae* was gekweekt, was ook het onderzoek in één of meer serologische reacties positief. Bij alle 10 patiënten was de ELISA-IgM positief; 9 keer was de waarde hoger dan 16 E.U. (argumenten voor de keuze van deze grens worden in Hoofdstuk 8 gegeven) en éénmaal (no. 2) bedroeg deze 12 E.U. Bij 8 patiënten was er een titerstijging in ELISA-IgM, bij twee (no. 8 en 10) was er een daling. Ook in ELISA-IgG werd bij alle patiënten op twee na (no. 2 en 10) een titerstijging gevonden.

7.2. ONDERZOEK BIJ PATIËNTEN ZONDER ZEKERE DIAGNOSE

De bevindingen bij 8 patiënten (no. 11-18) bij wie -naast serologisch onderzoek- een kweekproef was verricht, maar van wie de diagnose niet vaststaat, zijn in Tabel 7.2. weergegeven. De kweekproef was bij hen negatief. Drie van deze patiënten (no. 11, 12 en 13) hadden pneumonie tijdens de epidemie in "De Binckhorst". Hoewel bij hen de keeluitstrijk en sera te laat waren afgenomen om nog een zekere diagnose te kunnen stellen, mag men toch aannemen dat de infectie door *M. pneumoniae* werd veroorzaakt. De -geringe- titerstijging in ELISA-IgG en de titerdaling in ELISA-IgM van één patiënt (no. 11) en de titerdaling in ELISA-IgG van de twee andere, past bij een *M. pneumoniae*-infectie enige tijd tevoren. De volgende patiënt (no. 14) toont een met de eerstgenoemde patiënt (no. 11) vergelijkbaar verloop van antistoftiters; dit zou, mede gezien de hoge titer in de koude agglutinatie kunnen wijzen op een -mogelijk al iets langer bestaande- infectie met *M. pneumoniae*.

De patiënt (no. 15) die een hartoperatie had ondergaan, toonde alleen een titerstijging in ELISA-IgG en in de CBR. Titerstijgingen ten opzichte van *M. pneumoniae* werden door Freeman *et al.*

(1973) gezien bij ruim 20% van patiënten die een open hart-operatie hadden ondergaan; het is niet zeker dat deze door een infectie met *M. pneumoniae* worden veroorzaakt. Bij 3 patiënten (no. 16-18) werden geen tekenen van een recente infectie door *M. pneumoniae* gevonden.

Verder zijn in Tabel 7.2. de bevindingen weergegeven bij 3 contactpersonen zonder ziekteverschijnselen uit "De Binckhorst" (no. 19-21), bij wie een kweekproef was verricht met een positief resultaat. De infectie had bij hen klaarblijkelijk een subklinisch verloop. Dit kan, blijkens de resultaten bij twee van hen (no. 19 en 21), gepaard gaan met hoge spiegels van IgM-antilichamen.

7.3. VERLOOP VAN ANTISTOFTITERS IN VERSCHILLENDE REACTIES

De gegevens van Tabel 7.1. geven een indruk over de snelheid van vorming van antistoffen in de eerste weken na het begin van de ziekte, en -samen met gegevens van Tabel 7.2.- over het verloop van de titers daarna.

Eerst bespreken wij de resultaten in de eerste drie weken na het begin van de ziekte. Hierbij laten wij één patiënt (no. 8) buiten beschouwing, omdat deze mogelijk -de dalende titers in ELISA-IgM, CBR en IHA wijzen hierop- al langer ziek was dan de opgegeven eerste ziektedag aangeeft.

Van 5 patiënten (no. 3-7) zijn sera in de eerste week van de ziekte afgenomen. Van deze sera zijn de titers noch voor IgM-, noch voor IgG-antilichamen duidelijk verhoogd. Van 2 patiënten zijn sera op de 8e dag afgenomen (no. 2 en 9); deze hebben matig verhoogde titers in ELISA-IgM (12 en 4,7 E.U.) en uiteenlopende titers in ELISA-IgG (2,1 en 173 E.U.). De titer in IHA bedraagt 20 voor beide sera (juist op de grens tussen positief en negatief). De sera van 8 patiënten (no. 1, 3-7, 9 en 10) die tussen de 13e en de 20e dag zijn afgenomen, hebben alle duidelijk verhoogde titers in ELISA-IgM (16,2-434 E.U.). Bij 7 van de 8 patiënten (no. 1, 3-7 en 9) zien wij dat de IgM-antistofspiegels in de loop van de tweede week stijgen. Deze stijging loopt meestal parallel met die van IgG-antistoffen (uitzondering: no. 6) en

Tabel 7.1. Onderzoek van patiënten met een pneumonie door M. pneumoniae

Pat. no.	Gesl.	Leeftijd	Rwaskoproef (ziektedag en resultaat)	Serologisch onderzoek op M. pneumoniae							Ziektebeeld en bijzonderheden
				ziektedag (d) = week (w)	CBR (titer)	ELISA (E.U.) IgM IgG		MDH (titer)	IHA (titer)	KA ² (titer)	
R 1	v	28	N.V.	prae	<2	2,0	2,3	<10	<10		ernstige pneumonie
				16e (d)	128	310	55	32	2560	>128	
				10e (w)		95	49	64	320		
				12e (w)		78	41	64	320		
				14e (w)		64	38	64	160		
				16e (w)		44	52	64	160		
				18e (w)		41	48	64	80		
				21e (w)		40	36	32	160		
				24e (w)		53	55	64	80		
				26e (w)		24	43	32	80		
				48e (w)		24	22	32	80		
				76e (w)		14	10	16	40		
				98e (w)		8,7	8,0	N.V.	40		
R 2	v	28	8e Pos.	prae	<2	1,5	25	N.V.	N.V.		matig ernstige pneumonie,
				8e (d)	<2	12	2,1		20	Neg.	7 maanden gravida
R 3	m	8	9e Pos.	7e (d)	2	0,5	<0,25	N.V.	<10		longaandoening rechter
				18e (d)	>128	82	82		160	Neg.	middenklob
R 4	v	20	10e Pos.	5e (d)	2	2,1	3,5	2	10		ernstige pneumonie, oorspijn, titerafwijking in HAR voor parainfluenza van <10 + 40
				13e (d)	128	434	166	128	>5120	256	
				4e (w)		220	215	>256	>5120		
				6e (w)		>1000	197	256	>5120		
				8e (w)		859	145	128	>5120		
				10e (w)		202	171	128	>5120		
				12e (w)		243	148	128	>5120		
				17e (w)		144	143	128	1280		
				21e (w)		114	97	128	1280		
R 5	v	34	13e Pos.	6e (d)	4	0,2	0,2	N.V.	N.V.	N.V.	pneumonie links achter
				18e (d)	16	24	109		320		
C 6 ¹	m	6	22e Pos.	7e (d)	<2	3,0	0,5	<2	<10	N.V.	arthritis en exantheem bij pneumonie
				18e (d)	32	48	1,8	16	640		
				11e (w)	64	7,0	27	32	10		
B 7	m	21	6e Pos.	6e (d)	<2	1,0	<0,25	2	<10	32	pneumonie
				19e (d)	>128	85	66	128	>2560		
				6e (w)		41	38	128	640		
				8e (w)		24	30	128			
				11e (w)		15	18	128			
				13e (w)		15	16	64			
				15e (w)		10	14	128			
				17e (w)		12	12	64			
				23e (w)		5,6	8	32			
B 8	v	18	6e Pos.	6e (d)	16	73	4,2	128	640	512	pneumonie
				3e (w)	8	53	3,4	>256	320		
				7e (w)		18	8,2	64			
				9e (w)		9,1	11	64			
				12e (w)		5,8	20	64			
				14e (w)		7,4	29	64			
				18e (w)		4,7	22	64			
				24e (w)		2,4	15	32			
R 9	m	33	10e Pos.	8e (d)	32	4,7	173	N.V.	20	N.V.	lobaire pneumonie rechts onder
				18e (d)	>128	16,2	431		N.V.		
R 10	m	7	47e Pos.	14e (d)	>128	199	235	N.V.	>5120	N.V.	pneumonie, patiënt kreeg erythrosyline
				6e (w)	>128	38	98		640		

Tabel 7.2. Onderzoek van patiënten met onzekere diagnose

Pat. no.	Gesl.	Leeftijd	Kweekproef (ziektedag en resultaat)	Serologisch onderzoek op <i>M. pneumoniae</i>							Ziektebeeld en bijzonderheden
				ziektedag (d) = week (w)	CBR (titer)	ELISA (E.U.) IgM IgG		MDH (titer)	IHA (titer)	RA ² (titer)	
B 11	v	12	38e Neg.	5e (w)	32	68	12	64	N.V.	8	pneumonie
				7e (w)		33	12	128	40		
				11e (w)		28	27	128	10		
				14e (w)		15	27	N.V.			
				22e (w)		12	30	64			
				28e (w)		7,9	N.V.	64			
B 12	m	14	70e Neg.	8e (w)	16	3,4	48	256	<10	16	pneumonie
				10e (w)	16	3,8	55	256	<10		
				16e (w)		2,7	32	256	<10		
				20e (w)		2,6	22	>256	<10		
				24e (w)		2,3	21	128	<10		
				30e (w)		1,9	18	128	<10		
B 13	m	19	88e Neg.	12e (w)	<2	3,1	7,2	N.V.	<10	32	pneumonie
				15e (w)	<2	3,4	7,1		<10		
				21e (w)		2,8	7,4		<10		
				25e (w)		1,7	3,0		<10		
				29e (w)		4,3	3,9		<10		
				35e (w)		2,4	3,2		<10		
R 14	v	14	10e Neg.	10e (d)	<2	12	11	N.V.	<10	256	luchtweginfectie; kreeg erythromycine; 6 wk. tevoren mononucleosis infectiosa
				19e (d)	<2	8,2	10		10		
				7e (w)	<2	5,1	35		10		
R 15	v	44	12e Neg.	prae	<2	2,3	3,8	N.V.	<10	Neg.	open hart-operatie, hierna febris e.c.i.
				10e (d)	32	1,4	15		<10		
R 16	m	1	14e Neg.	2e (w)	8	7,0	18	N.V.	10	N.V.	interstitiële pneumonie; rec. otitis
				5e (w)	8	4,7	16				
R 17	v	8	3e Neg.	3e (d)	<2	0,7	<0,25	N.V.	<10	Neg.	pneumonie rechts boven
				11e (d)	<2	0,8	0,3				
R 18	m	25	3e Neg.	3e (d)	16	0,8	11	N.V.	<10	Neg.	pneumonie; titerstijging in HAR parainfluenza (80 → 320)
				3e (w)	8	0,7	4,0		<10		
B 19	m	10	? ¹ Pos.	? ¹	N.V.	56	22	N.V.	80	N.V.	niet ziek; positieve kweekproef bij contact-onderzoek
			42e Neg.	4e (w)		18	9,0		10		
				10e (w)		3,7	6,5				
				12e (w)		1,2	5,7				
				16e (w)		0,8	3,0				
				22e (w)		0,7	2,1				
B 20	m	17	? ¹ Pos.	? ¹	32	2,1	88	N.V.	10	N.V.	als 19
			42e Neg.	4e (w)	16	3,6	59		10		
				8e (w)		3,4	51				
				12e (w)		3,3	38				
				16e (w)		3,3	35				
				22e (w)		1,4	26				
B 21	v	19	? Pos.	?	32	36	82	N.V.	N.V.	N.V.	als 19

N.V. = niet verricht

¹ = R = St. Radboudziekenhuis; C = Canisius-Wilhelminaziekenhuis; B = tehuis "De Binckhorst"² = koude-agglutinatiereactie, verricht in het laboratorium van de Universitaire Transfusiedienst (Hoofd: Prof. Dr. V.A.J.M. Kunst); titers <64 worden als normaal beschouwd.³ = deze patiënt werd reeds beschreven (van Griethuysen et al., 1981)⁴ = de dag van isolatie van *M. pneumoniae* werd bij niet-zieke contactpersonen als eerste ziektedag beschouwdIn tabel 7.1. zijn patiënten opgenomen bij wie de diagnose pneumonie door *M. pneumoniae* vaststaat.In tabel 7.2. zijn opgenomen. 8 patiënten met een negatieve kweekproef -van wie de eerste 5 mogelijk toch een infectie met *M. pneumoniae* hadden- en 3 patiënten zonder klinische symptomen, van wie bij contact-onderzoek de kweekproef positief bleek.

van complementbindende antistoffen (uitzondering: no. 2).

Bij 6 patiënten (1, 4, 6, 7, 8 en 11) van wie gedurende een lange periode bloed was afgenomen, werd onderzoek gedaan naar het verdere verloop van de antistofspiegels. De maximale spiegel van IgM-antistoffen, variërend van 48 tot meer dan 1000 E.U., werd bereikt in de loop van de derde week, in één geval (no. 4) enkele weken later. Daarna daalde de spiegel vrij snel, na 8-26 weken tot waarden van minder dan 16 E.U. Bij twee patiënten (no. 1 en 4) werden na 48, respectievelijk 21 weken nog titers van respectievelijk 24 en 114 E.U. gevonden. De maximale spiegels bij de twee laatstgenoemde patiënten -die 2½ en 6 weken na het begin van de ziekte waren aangetoond- waren zeer hoog (310 en meer dan 1000 E.U.). Bij 1 patiënt (no. 1) waren na 98 weken nog IgM-antistoffen (8 E.U.) aantoonbaar. Dat IgM-antistoffen lang kunnen persisteren, werd eerder beschreven door Biberfeld (1971 i) en Skaug *et al.* (1976).

Zoals in Hoofdstuk 8 zal worden besproken, mag men aannemen dat een -in één serum bepaalde- spiegel van IgM-antistoffen van 16 E.U. of meer diagnostische betekenis heeft. Alle sera van patiënten met een pneumonie door *M. pneumoniae*, die meer dan 10 dagen en minder dan 7 weken na het begin van de ziekte waren afgenomen voldeden aan dit criterium. Lagere waarden, zoals die bij twee patiënten (no. 2 en 15) werden gevonden, kunnen een aanwijzing voor infectie met *M. pneumoniae* vormen; bij de interpretatie hiervan zal men het klinische beeld moeten betrekken. Dergelijke waarden kunnen zeker een argument zijn om, eerder dan gebruikelijk, opnieuw bloed af te nemen voor diagnostisch onderzoek, bv. reeds na enkele dagen.

Het verloop van de IgG-antistofspiegels was minder karakteristiek. In sommige gevallen (no. 6, 8 en 11) bleef de spiegel constant of steeg nog, terwijl de IgM-antistofspiegel reeds daalde. In enkele andere gevallen (no. 1, 4, 7) daalde de spiegel. Bij twee patiënten (no. 1 en 7) verliep deze daling min of meer parallel aan die voor IgM-antistoffen. Dit is opmerkelijk, omdat IgM-antistoffen een kortere levensduur hebben dan IgG-antistoffen en men in het algemeen ziet dat titers van IgM-antistoffen na een infectie sneller dalen.

De uitkomsten van de IHA stemmen goed overeen met die van

ELISA-IgM. Alle sera, die tenminste 8 dagen en ten hoogste 7 weken na het begin van de ziekte waren afgenomen, waren bij onderzoek in de IHA positief (titer groter dan 10). Op de betekenis hiervan voor de diagnostiek van *M. pneumoniae*-infecties wordt in het volgende hoofdstuk ingegaan.

Ter controle werd in enkele gevallen (no. 1, 4, 6, 7, 8, 11 en 12) onderzoek door middel van MIH verricht. Men mag aannemen dat van de toegepaste reacties de MIH het meest specifiek is, mits de patiënten niet met antibiotica zijn behandeld. Bij 5 van de 7 onderzochte patiënten werd de diagnose bevestigd op grond van de significante titerstijging in MIH. Bij twee patiënten werd in het eerste serum reeds een hoge antistoftiter in MIH gevonden evenals in andere reacties (respectievelijk in CBR, ELISA-IgM en IHA (no. 11) en in ELISA-IgG (no. 12)). De MIH-titer steeg hierna en daalde vervolgens geleidelijk. Ook deze laatste bevindingen mogen als een bevestiging van de diagnose worden beschouwd. De MIH is bewerkelijk en derhalve niet geschikt voor de routine-diagnostiek.

CONCLUSIE

De spiegels van IgM-antilichamen stijgen bij patiënten met pneumonie door *M. pneumoniae* in de regel in de loop van de tweede week om in de derde week of iets later een hoogtepunt te bereiken. Duidelijk verhoogde spiegels (van meer dan 16 E.U.) kunnen gedurende lange tijd -8 weken tot een jaar- aanwezig blijven.

BETEKENIS VAN ELISA-IgM EN IHA VOOR DE DIAGNOSTIEK VAN
MYCOPLASMA PNEUMONIAE-INFECTIES

In de voorafgaande hoofdstukken bleek dat ELISA een gevoelige en specifieke methode is om antistoffen tegen *M. pneumoniae* aan te tonen. Het aantonen van specifieke IgM-antistoffen wordt beschouwd als een waardevol hulpmiddel voor de snelle diagnostiek van vele infecties, omdat deze antistoffen in de regel slechts korte tijd (enkele weken tot ten hoogste enkele maanden) aantoonbaar zijn.

Wij verwachtten dat dit ook het geval zou zijn voor *M. pneumoniae*-infecties. Het blijkt echter (Hoofdstuk 9) dat in de "normale" bevolking lage spiegels van IgM-antistoffen aantoonbaar zijn. Bij ongeveer 5% van de "normale" bevolking vonden wij 8 of meer E.U. IgM-antistoffen, bij ongeveer 1% 16 E.U. of meer (Hoofdstuk 9). Deze bevindingen hebben wij gebruikt om een grens te kiezen ten behoeve van de diagnostiek (zie hieronder).

Bij drie groepen patiënten met infecties door *M. pneumoniae* gingen wij retrospectief na of ELISA-IgM een bijdrage zou hebben kunnen leveren tot een -snellere- diagnostiek van de infectie. Ook de indirecte haemagglutinatietest (IHA) werd in dit onderzoek betrokken, omdat deze methode zoals in Hoofdstuk 6 werd beschreven, vooral gevoelig is voor IgM-antilichamen. Wij hebben niet alleen een titerstijging in de CBR en een positieve uitslag van een kweekproef, maar ook een hoge titer (>64) van het eerste en tweede serum in de CBR (zonder titerstijging) als criterium voor een aanwezige infectie met *M. pneumoniae* beschouwd.

De eerste groep bestond uit de 47 patiënten met een titerstijging in de CBR (2.5.2.2.), waarvan al in Hoofdstuk 6 de resultaten werden beschreven. Vijf van de 47 patiënten bij wie noch in ELISA-IgM, noch in ELISA-IgG een titerstijging werd gevonden, werden niet in het in Tabel 8.1. weergegeven onderzoek betrokken, wel in Fig. 8.1.A., B. en C. De tweede groep bestond uit 32 patiënten met hoge titers in de CBR, zonder titerstijging (titer in beide sera van serumparen >64 ; 2.5.2.3.). De derde groep bestond uit de

Tabel 8.1. Resultaten van onderzoek door middel van ELISA en IHA bij 84 patiënten met infectie door M. pneumoniae

Diagnose	Aantal onderzochte patiënten	ELISA-IgM positief (>16 E.U.)	IHA positief (titer >20)	Titerstijging (>2-voudig)	
				in ELISA-IgG	alleen in ELISA-IgM ²
pneumonie	37	34 (15) ¹	34 (15) ¹	26	2
luchtweginfectie (niet nader omschreven)	26	26 (22)	24 (20)	3	-
exacerbatie van CARA	5	0	3 (0)	4	1
overige ³	16	5 (2)	6 (2)	12	4
Totaal	84	63 (39)	67 (37)	45	7

¹Tussen haakjes: aantal patiënten, van wie het eerste serum positief was

²Titerstijging tot minder dan 16 E.U. IgM; IHA negatief; geen titerstijging in ELISA-IgG.

³Diagnose: koorts (8 maal, waarvan 2 maal met meningitis- en éénmaal met encephalitisverschijnselen); pleuritis, gastroenteritis, paratyphus (2x), leverfunctiestoornissen, icterus, carcinoom, onbekend.

10 patiënten van Tabel 7.1., bij wie de kweekproef positief was of een titerstijging in de CBR was aangetoond.

Als positief (voor het stellen van de diagnose: infectie met *M. pneumoniae*) beschouwden wij de volgende resultaten: voor ELISA-IgM >16 E.U.; voor IHA een titer van 20 of hoger en voor ELISA-IgG een tweevoudige titerstijging.

In Tabel 8.1. worden de resultaten van deze onderzoeksmethoden in relatie tot de diagnose weergegeven. Bij de 63 patiënten met een pneumonie of een -door onvoldoende klinische gegevens- niet nader omschreven luchtweginfectie ("mogelijke pneumonie") is de ELISA-IgM 58 maal (92%) positief en de IHA ook 58 maal. Bovendien zou men met ELISA-IgM nog 3 maal een vermoedelijke diagnose hebben kunnen stellen op grond van een titer tussen 8 en 16 E.U. (zie Hoofdstuk 7.3.).

In veel gevallen (37 van de 63, 59%) zou men de diagnose hebben kunnen stellen aan de hand van het onderzoek van het eerste serum. Dit hangt samen met het tijdstip na het begin van de ziekte, waarop de IgM-antilichamen een niveau met diagnostische betekenis bereiken. Bij de 10 patiënten uit Hoofdstuk 7 bleek dit meestal in de loop van de 2e week het geval te zijn. Fig. 8.1.A., die de groep van 47 patiënten met een titerstijging in de CBR betreft, laat zien dat dit ook voor een deel van deze patiënten geldt. Tien patiënten tonen een titerstijging tot meer dan 16 E.U. IgM-antilichamen (en 2 tot meer dan 8 E.U.). Door middel van interpolatie krijgt men een indruk over het tijdstip waarop dit niveau zou zijn bereikt. Dit lijkt meestal (7 van de 10 gevallen) tussen de 10e en 14e dag te liggen. Daarnaast blijkt uit de figuur dat van 11 patiënten het eerste serum, dat na een $\frac{1}{2}$ tot 1 week was afgenomen, al positief was. Het is mogelijk dat bij een deel van deze patiënten niet de dag van de eerste symptomen, maar die van de eerste ernstige ziekteverschijnselen is opgegeven. Dit zou het verschil tussen deze groep en de groep van 10 patiënten (Tabel 7.1.) kunnen verklaren. De reacties in de IHA van de sera van de 47 patiënten tonen een overeenkomstig verloop (Fig. 8.1.C.).

Volgens deze resultaten mag men verwachten dat men in geval van pneumonie door middel van ELISA-IgM en IHA aan de hand van één serum de diagnose infectie door *M. pneumoniae* kan stellen. Beide methoden waren bij de 63 onderzochte patiënten even vaak

positief (92%). Bij 59% was het eerste serum al positief. In deze gevallen zou ELISA-IgM of IHA dus zeker tot een snellere diagnostiek hebben bijgedragen. In die gevallen waar het eerste serum niet positief is, zou men de diagnostiek mogelijk kunnen versnellen, door een 2e serum op de 14e ziektedag, of iets eerder, te onderzoeken. Uit ons onderzoek blijkt dat dan, in gevallen van pneumonie door *M. pneumoniae*, de sera meestal positief zijn. Dit is, wat betreft de IHA in overeenstemming met de resultaten van Taylor (1979; 1980), die opgeeft, dat deze reactie na ongeveer 14 dagen positief wordt en daarna ongeveer 8-10 weken positief blijft.

De kans dat met ELISA-IgM en IHA een fout-positieve diagnose wordt gesteld, is gering. Van 272 door ons onderzochte sera (2.5.5.1.; beschreven in Hoofdstuk 9.2.5., Fig. 9.2.) hadden slechts 2 een titer van meer dan 16 E.U. IgM-antilichamen (respectievelijk 16,3 en 78 E.U.). Bij onderzoek van sera van 400 gezonde donoren in de IHA werd slechts bij twee van hen een titer groter dan 10 gevonden (beide sera hadden een titer van 40; niet gepubliceerd onderzoek door Dr. J.G.A. Borghans van het Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid in Nijmegen, 1981).

Tot nu toe werd de koude-agglutinatiereactie gebruikt voor de "snelle" diagnostiek van *M. pneumoniae*-infecties. Deze methode is slechts weinig gevoelig (40-45%) en niet specifiek (zie Hoofdstuk 1). Er is ons slechts één onderzoek bekend met gegevens over het tijdstip waarop de koude-agglutinatiereactie positief wordt, die zich lenen voor vergelijking met onze gegeven betreffende ELISA-IgM en IHA (Biberfeld, 1971 i). Dit onderzoek wijst er niet op dat de koude-agglutinatiereactie eerder positief wordt dan ELISA-IgM of IHA. ELISA-IgM en IHA verdienen dus de voorkeur boven de koude-agglutinatiereactie voor de diagnose van pneumoniën door *M. pneumoniae*.

Van de 21 patiënten, bij wie (mogelijke) pneumonie niet het voornaamste symptoom was (de onderste twee diagnose-groepen in Tabel 8.1.), waren 5 positief in ELISA-IgM en 9 in de IHA. Zestien patiënten toonden een titerstijging in ELISA-IgG. Bij deze groepen patiënten was diagnostiek aan de hand van één (eerste) serum slechts in 2 gevallen mogelijk. Aangezien de aantallen klein

Fig. 8.1.A.

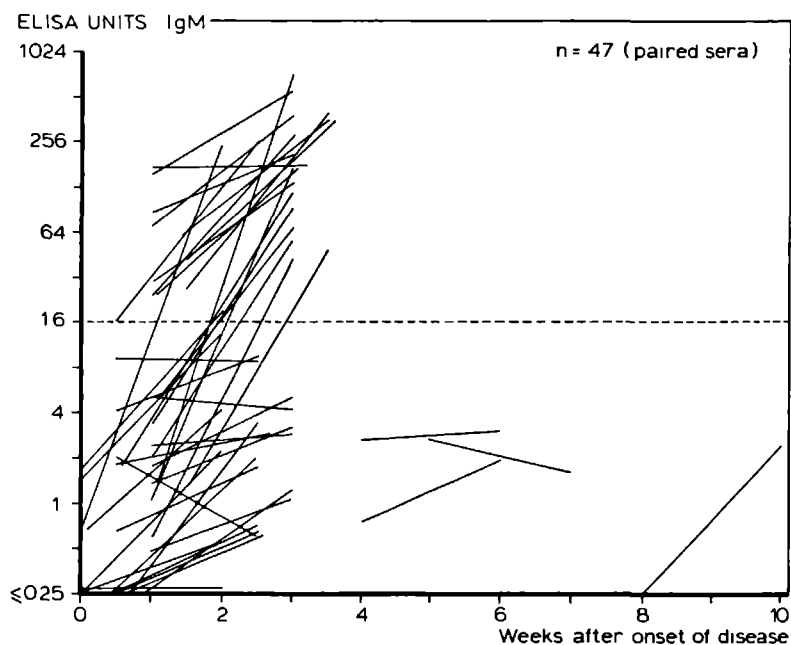


Fig. 8.1.B.

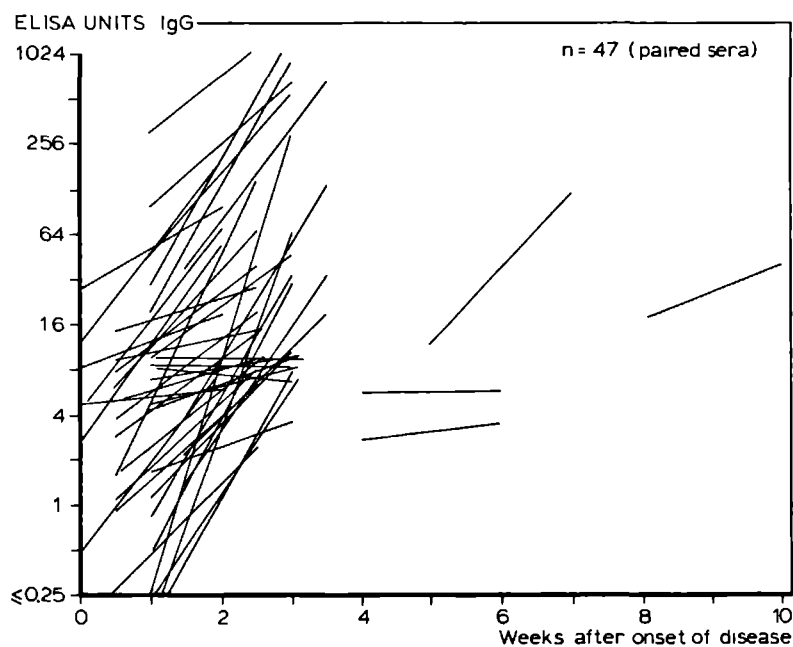


Fig. 8.1.C.

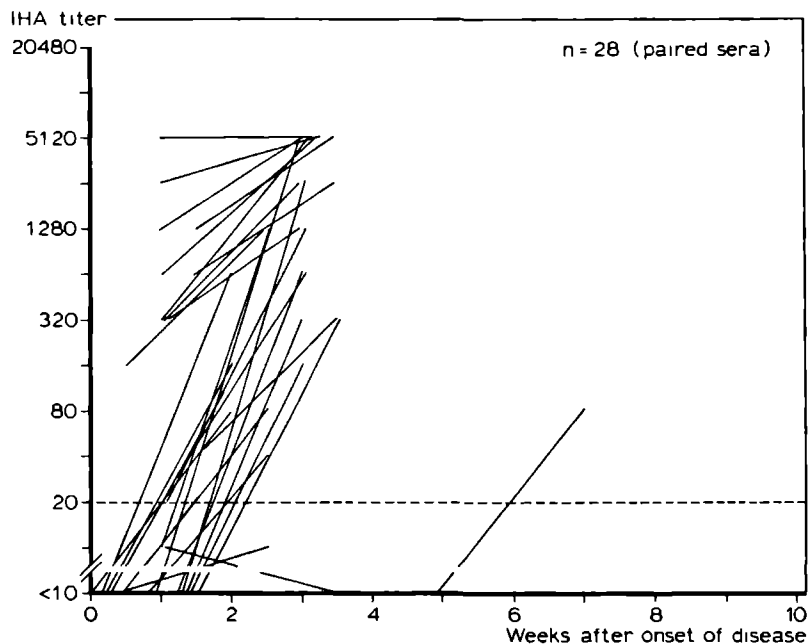


Fig. 8.1. Verloop van de titer in ELISA en IHA van serumparen van 47 patiënten in relatie tot de ziekteduur

A. ELISA-IgM

B. ELISA-IgG

C. IHA (de uitkomsten van 19 serumparen met een titer <10 in beide sera zijn weggelaten)

De onderbroken lijn in A en C geeft de grens weer (bij respectievelijk 16 E.U. IgM-antilichamen en een IHA titer van 20), waarboven één enkele bepaling diagnostische betekenis heeft.

zijn, is het wenselijk nader onderzoek te doen naar de diagnostische betekenis van de verschillende onderzoeksmethoden bij patiënten met *M. pneumoniae*-infecties zonder duidelijke pneumonie.

CONCLUSIE

ELISA-IgM en de indirecte haemagglutinatietest zijn geschikt voor de diagnostiek van pneumonie door *M. pneumoniae*. In veel gevallen kan men de diagnose stellen aan de hand van onderzoek van één enkel serum (het eerste serum). De beide methoden kunnen bijdragen tot een snellere diagnostiek. Ze zijn specifiek voor *M. pneumoniae* en gevoeliger dan de koude-agglutinatiereactie.

SERO-EPIDEMIOLOGISCH ONDERZOEK

Om inzicht te verkrijgen in de epidemiologie van infecties met *M. pneumoniae* hebben wij onderzoek verricht naar het voorkomen van antistoffen tegen *M. pneumoniae* bij 1437 personen van verschillende leeftijden. Voor zover ons bekend is, is een sero-epidemiologisch onderzoek van deze omvang nog niet eerder uitgevoerd. ELISA lijkt een geschikte methode voor een dergelijk onderzoek vanwege zijn gevoeligheid en specificiteit en vanwege de mogelijkheid van automatische verwerking van de gegevens. Wij hebben in de eerste plaats onderzoek verricht op IgG-antilichamen, omdat deze antilichamen in de regel lang aanwezig blijven en de aan- of afwezigheid van deze antilichamen dus uitsluitsel geeft over een voorafgaande infectie. Daarnaast hebben wij -om een indruk te verkrijgen van het voorkomen van IgM-antistoffen en van de epidemiologische betekenis hiervan- een deel van de sera ook met ELISA-IgM onderzocht.

Omdat het door ons gebruikte antigeen glycolipiden bevat, die kruisreacties kunnen tonen met plantaardige glycolipiden (Kenny en Newton, 1973), werd ter vergelijking een klein deel van de sera onderzocht met behulp van een commercieel, glycolipidevrij antigeen van *M. pneumoniae* (Orion-antigeen, Räisänen, 1980). Deze proeven werden eveneens met ELISA uitgevoerd.

Het onderzoek werd gedaan met sera van patiënten bij wie een vermoeden op toxoplasmose bestond. Wij kozen sera uit 1977, het jaar voor de epidemie van 1978/1979, 2 à 3 jaar na die van 1974/1975¹. Hierdoor is de invloed van de epidemieën op de resultaten zo gering mogelijk. Om toch een indruk te krijgen van het effect van een epidemie, onderzochten wij sera van één leeftijdsgroep,

¹De jaartallen van de epidemieën zijn af te leiden uit de verslagen van het laboratorium voor virologie in de "Berichten uit het Rijks Instituut voor de Volksgezondheid", jaargangen 1973-1979. In beide gevallen speelde de epidemie zich voornamelijk af in het eerste van de twee genoemde jaren.

4 en 5 jaar, uit 1979. Deze leeftijdsgroep werd gekozen, omdat epidemieën zich vooral onder kleuters zouden verspreiden (Foy *et al.*, 1970) en op deze leeftijd dus het grootste verschil in prevalentie en spiegels van antistoffen voor en na de epidemie is te verwachten. De resultaten van het serologische onderzoek op *M. pneumoniae* worden in dit hoofdstuk weergegeven en besproken. In het volgende hoofdstuk trachten wij op basis van deze resultaten aan de hand van katalytische modellen (Muench, 1959) inzicht te verschaffen in de epidemiologie van *M. pneumoniae*-infecties.

9.1. MATERIAAL EN METHODEN

De ELISA werd uitgevoerd zoals beschreven in Hoofdstuk 2.2. Voor de proeven met eigen (compleet) antigeen werden de sera verdund in PBS/Tween met 40% kweekmedium, de conjugaten in PBS/Tween met 10% kweekmedium. Voor de proeven met Orion-antigeen werden sera en conjugaten verdund in PBS/Tween met 2% foetaal kalverserum. De spiegel van de antilichamen werd uitgedrukt in ELISA-eenheden (E.U., 2.2.7.). Omdat voor veel berekeningen de logaritmie van het resultaat moest worden gebruikt, werden de uitkomsten soms als een logaritmie uitgedrukt en wel de $^2\log$ van het aantal E.U. (weergegeven als TEU). Een verschil van 1 TEU komt dan overeen met een tweevoudige verdunning. Sera met minder dan 0,25 E.U. -waarvan de waarde onnauwkeurig is door extrapolatie (Hoofdstuk 5.2.)- werden als "echt" negatief beschouwd. Zij kregen voor een aantal statistische beschrijvingen arbitrair de waarde 0,125 E.U. (TEU = -3) toegekend.

De sera werden geselecteerd uit de sera die in 1977 (en voor één leeftijdsgroep in 1979) voor onderzoek op toxoplasmose waren ingestuurd. De wijze van selectie en de verdeling van de sera over de assays zijn beschreven in 2.5.5. De proeven met de sera uit 1977 werden met één batch conjugaat uitgevoerd. Voor de proeven met Orion-antigeen en die met de sera uit 1979 werd een nieuwe batch conjugaat gebruikt.

De resultaten werden statistisch bewerkt door de Mathematisch Statistische Adviesafdeling van de Katholieke Universiteit (Dr. J.A.M. van Druten, A. Reintjes).

9.2.1. Conjugaat, inactiveren van sera, verdeling van sera over seizoen

In de loop van het onderzoek toonden de grenswaarde-extincties voor de berekening van de titers, zoals die voor iedere assay werden berekend, een dalende tendens. Dit bleek te berusten op teruggelopen activiteit van het conjugaat. Zolang de grenswaarde-extinctie tenminste 0,065 bedroeg, had de teruggang geen duidelijke invloed op de titer. Dit bleek uit de uitkomsten van de proeven met de positieve controlesera (die steeds in iedere assay werden onderzocht). In de gevallen dat de grenswaarde lager was dan 0,065 werd het assay herhaald.

Vergelijking van de resultaten van proeven met sera uit 1977 met eigen en Orion-antigeen liet zien dat een aantal sera zeer hoge titers met het eigen antigeen en lage titers met Orion-antigeen hadden. Dit betrof sera, die waren geïnactiveerd voordat ze werden ingevroren. Deze sera gaven in ELISA met eigen antigeen zowel voor IgG- als voor IgM-antistoffen, een afwijkend patroon te zien; bij toenemende verdunning liepen de extincties eerst op, daarna af. In de ELISA-IgG met Orion-antigeen was dit nauwelijks of niet het geval. Een deel van deze sera had in IHA hoge titers en gaf dikwijls ook agglutinatie van de controle-erythrocyten (zonder antigeen). Wij besloten daarom om alle sera, die geïnactiveerd waren, uit te sluiten. Hierdoor vielen 329 (22,9%) van de onderzochte sera af.

De uitsluiting van geïnactiveerde sera had geen duidelijke invloed op de verdeling van de overblijvende sera naar geslacht, geboortedatum of geboortemaand (van de patiënten van wie de sera afkomstig waren). Dit had echter wel effect op de verdeling van de sera naar maand van inzenden (Tabel 9.1.). Dit zou invloed kunnen hebben op het eindresultaat, als de resultaten gecorrigeerd zouden zijn met de maand van inzenden. Daarom hebben wij nagegaan, of er tussen de eerste en tweede helft van het jaar verschil was in de relatieve frequentie van sera die positief waren voor IgG-antilichamen. Hiervoor werden sera van de eerste 7

Tabel 9.1. Verdeling van onderzochte sera uit 1977 naar maand van inzenden

<u>Maand</u>	<u>Totale aantal sera</u>	<u>Niet geïnactiveerde sera</u>
1	232	--
2	192	114
3	193	190
4	127	122
5	79	77
6	120	119
7	82	81
8	111	108
9	75	72
10	87	86
11	76	76
12	63	63
	<hr/>	<hr/>
Totaal	1437	1108

leeftijdsgroepen gebruikt. In de eerste helft van 1977 was het percentage positieve sera iets hoger dan in de tweede helft; het verschil was echter niet significant ($p = 0,06$, gecombineerde χ^2 -toets). Voor IgM-antilichamen was er geen noemenswaardig verschil ($p = 0,76$).

9.2.2. Positieve controlesera

De resultaten van de proeven met positieve controlesera met behulp van eigen antigeen tonen een opvallend goede overeenkomst (Tabel 9.2.). Dit was zowel het geval in de serie proeven met sera uit 1979 als in die met sera uit 1977. Ook tussen de beide series bestond er een goede overeenkomst. Dit ondanks het feit dat in de beide series twee verschillende batches van het conjugaat waren gebruikt. Bij onderzoek van de controlesera met Orion-antigeen werden lagere waarden gevonden. Ook was de inter-assay-spreiding ervan groter.

Tabel 9.2. Gemiddelde titer, standaardafwijking en spreiding van de positieve referentiesera in de assays van het sero-epidemiologisch onderzoek

Klasse van antistoffen	Antigeen	Sera ingezonden in	n	E.U.	TGEM	S_b	S_t	D_b	D_t
IgM	Eigen	1977	20	22,0	4,46	0,27	0,30	0,74	1,46
		1979	7	20,0	4,32	0,23	0,48	0,55	1,27
	Orion	1977	5	5,3	2,41	0,43	0,45	1,26	1,48
IgG	Eigen	1977	80	32,2	5,01	0,27	0,39	0,83	2,59
		1979	7	33,1	5,05	0,32	0,44	0,70	1,50
	Orion	1977	5	9,9	3,31	0,66	0,45	1,95	2,05

n : aantal assays (2 bepalingen per assay)

E.U.: meetkundig gemiddelden van E.U. van referentiesera

TGEM: gemiddelde van de $^2\log$ E.U. (TEU)

S_b : inter-assay spreiding (duplo fout) $S_b = \sqrt{\sum d_i^2 / 2n}$, waarin d_i het verschil is tussen TEU_1 en TEU_2 (TEU van respectievelijk 1e en 2e bepaling in elk assay); $i = 1, n$.

S_t : inter-assay spreiding, berekend als volgt: $S_t = \sqrt{4(SD_1^2 + SD_2^2)}$, waarin SD_1 en SD_2 de standaardafwijking van respectievelijk TEU_1 en TEU_2 zijn.

D_b : maximale gevonden verschil tussen TEU_1 en TEU_2 in elke assay

D_t : verschil tussen kleinste en grootste aangetroffen TEU in alle assays van elke categorie

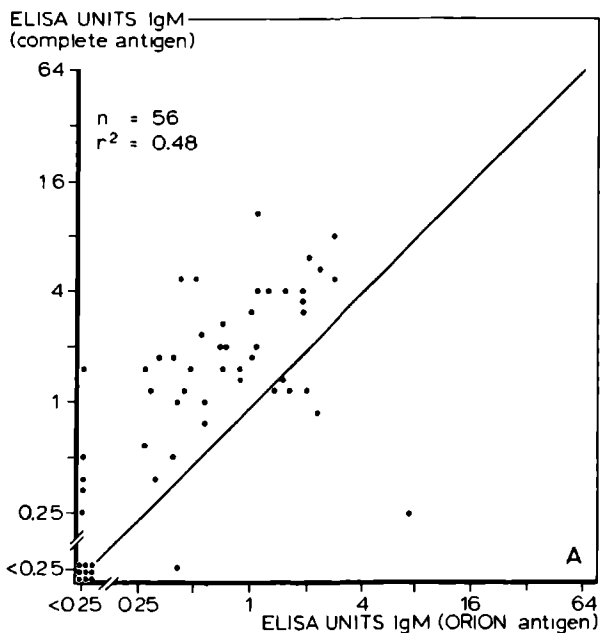
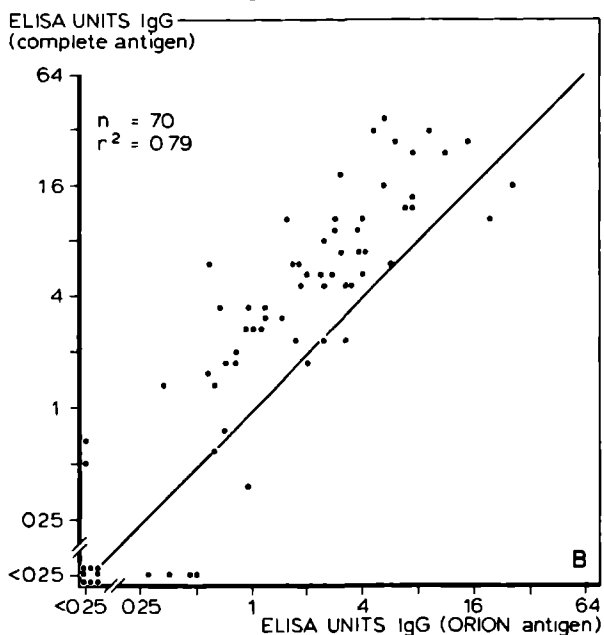


Fig. 9.1. Vergelijking van ELISA met eigen (compleet) antigeen en met Orion-antigeen (zonder glycolipiden)

A. ELISA-IgM

B. ELISA-IgG

De getrokken lijn is de lijn van equivalentie.



9.2.3. Vergelijking van de titers van antistoffen tegen toxoplasma met antistofspiegels voor M. pneumoniae

Wij hebben nagegaan of er een correlatie bestond tussen de antistoftiters in de immunofluorescentiereactie (IFT) op toxoplasma en het aantal E.U. in ELISA-IgM en -IgG op M. pneumoniae. Hiervoor werden sera van één leeftijdsgroep (20-30 jaar) gebruikt. Er werd geen significante correlatie gevonden.

9.2.4. Vergelijking van Orion-antigeen met eigen antigeen

Een groep sera werd in ELISA-IgG met eigen en Orion-antigeen onderzocht; een deel van deze groep sera werd ook in ELISA-IgM met beide antigenen onderzocht. De resultaten werden met behulp van correlatie-onderzoek vergeleken (Fig. 9.1., A en B). Er werd een positieve correlatie gevonden. De correlatie-coëfficiënt voor IgM-antilichamen werd nadelig beïnvloed door een uitschieter. De waarden voor het Orion-antigeen, die op dezelfde wijze werden berekend als die voor het eigen antigeen, lagen ongeveer één ²log (overeenkomend met een tweevoudige verdunning) lager dan die voor het eigen antigeen.

9.2.5. Verdeling van antistoftiters (E.U.) naar leeftijd

Fig. 9.2. en 9.3. tonen de verdeling naar leeftijd van IgG- en IgM-antistoftiters (uitgedrukt in E.U.) van 272 sera uit 1977 die zowel in ELISA-IgM als in ELISA-IgG waren onderzocht. Alle lage waarden (minder dan 0,25 E.U.) zijn weergegeven in de eerste, gearceerde kolom. De volgende punten van deze histogrammen vallen op.

De verdeling van de IgM-antistoftiters is voor de meeste leeftijdsgroepen bij benadering bimodaal. Twee subpopulaties kunnen worden onderscheiden, één van sera met zeer lage waarden (kleiner dan 0,25 E.U.) die als negatief werden beschouwd, en één van hogere waarden met een top tussen 1 en 2 E.U. bij jonge kinderen (jonger dan 2 jaar) of tussen 2 en 4 E.U. bij ouderen (4-15

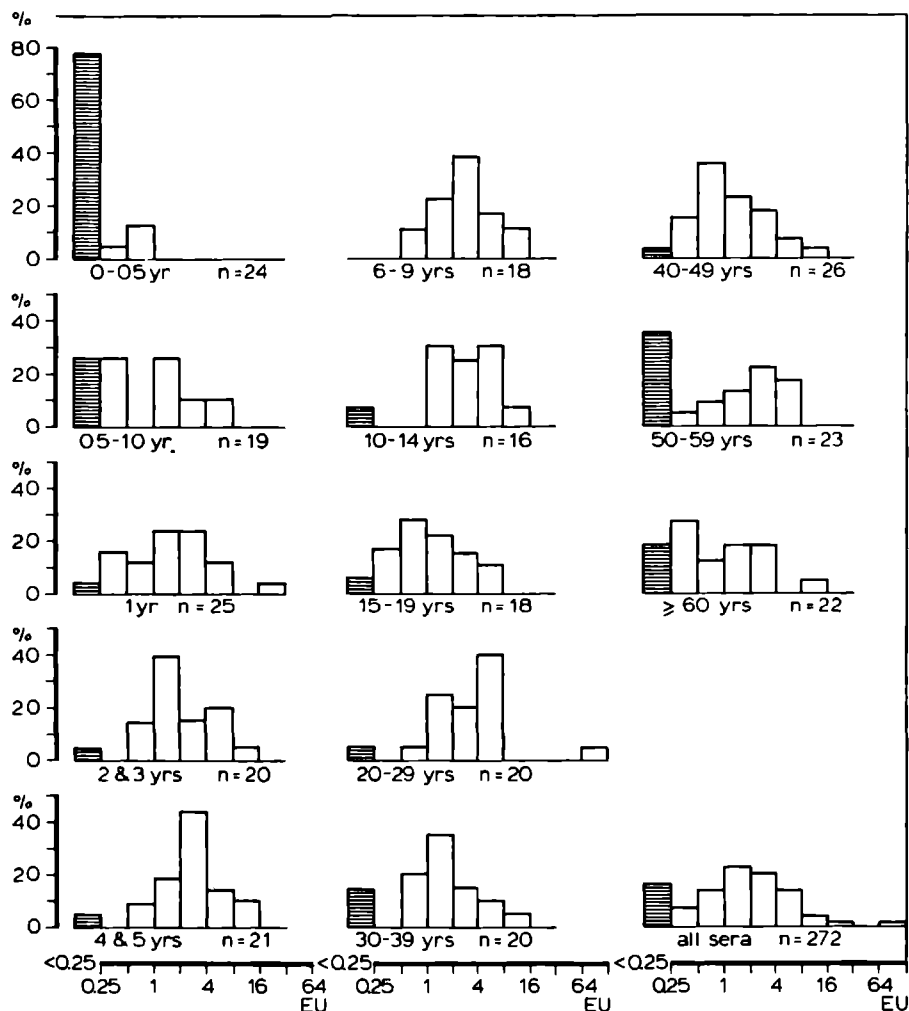


Fig. 9.2. Verdeling van IgM-antilichamen in 272 sera naar leeftijd en aantal E.U.

De gearceerde kolommen omvatten de sera met een negatief resultaat en die met <0,25 E.U.

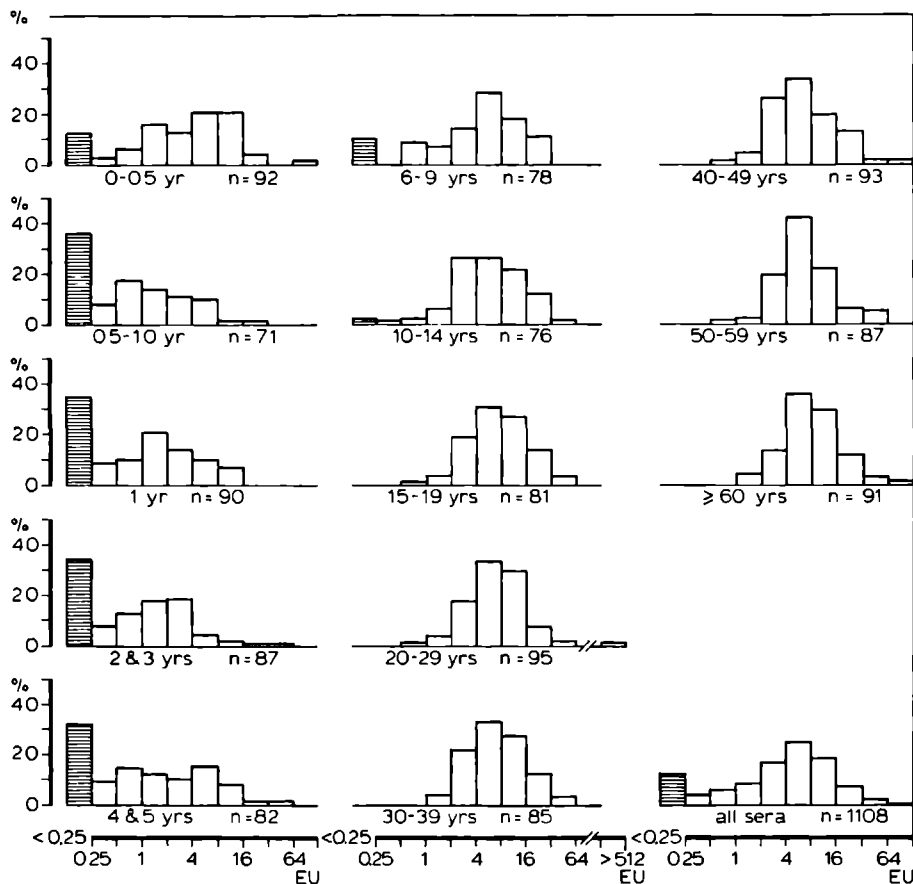


Fig. 9.3. Verdeling van IgG-antilichamen in 1108 sera naar leeftijd en aantal E.U.

De gearceerde kolommen omvatten de sera met een negatief resultaat en die met $<0,25$ E.U.

jaar.

Ook de verdeling van de IgG-antistoftiters is ongeveer bimodaal voorzover het sera van personen onder 10 jaar betreft; in één leeftijdsgroep (4-5 jaar) ziet men bij de hogere waarden twee toppen. De leeftijdsgroepen boven 15 jaar tonen geen bimodale verdeling. De eerste top van lage waarden (negatieve sera) ontbreekt.

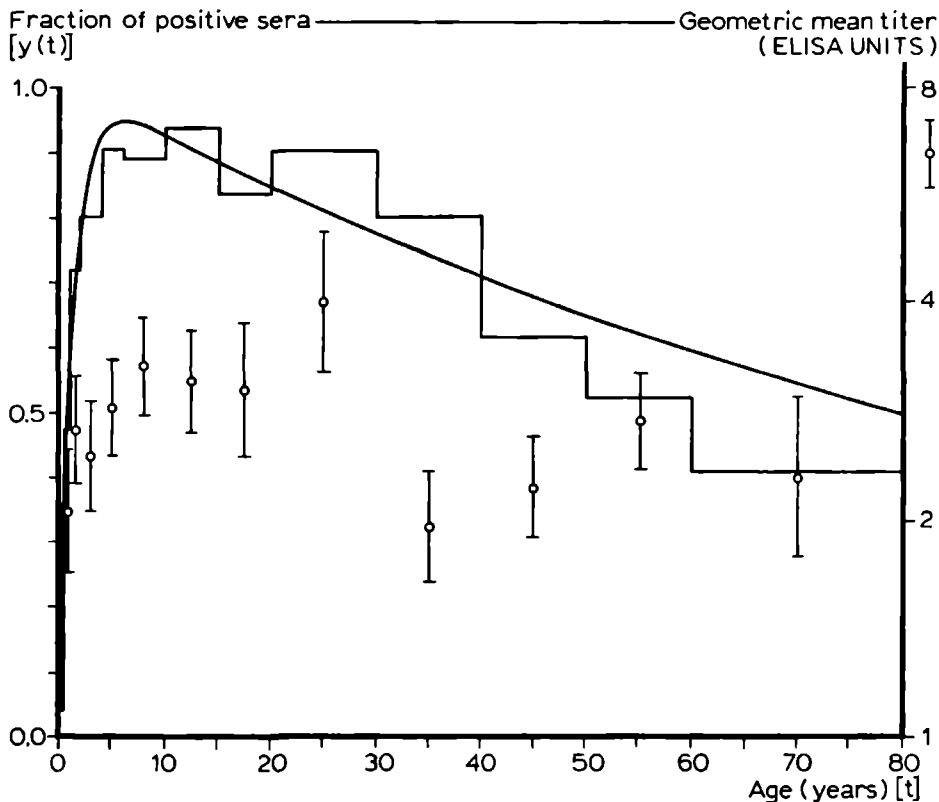


Fig. 9.4. Onderzoek van 272 sera in ELISA-IgM

Per leeftijdsgroep zijn de relatieve frequenties (fracties) van positieve sera weergegeven en het meetkundig gemiddelde ($\pm 1 \times$ de standaardafwijking van dit gemiddelde) van het aantal E.U. van de positieve sera. De katalytische curve:

$$y(t) = \frac{0,75}{0,75-0,009} (e^{-0,009t} + e^{-0,75t}) \text{ is ingetekend.}$$

9.2.6. Bepaling van de grens positief/negatief. Relatieve frequentie van positieve sera per leeftijdsgroep

Algemeen wordt aangenomen dat lage waarden in ELISA moeten worden toegeschreven aan niet-specifieke reacties. Dit fenomeen weerspiegelt zich in het bimodale patroon van de verdeling van sera van een normale populatie naar antistoftiter (E.U.). De eerste top stelt de groep van niet-specifiek reagerende (negatieve) sera voor, de tweede top de sera met antilichamen. Tussen de beide toppen ligt een grens die negatieve van positieve sera onderscheidt. Uit de histogrammen 9.3. en 9.4. zou men kunnen afleiden dat de grens bij ongeveer 0,5 E.U. ($TEU = -1$) moet liggen. Om dit nauwkeuriger te bepalen, werden de antistoftiters (per leeftijdsgroep) in kleinere klassen ingedeeld, namelijk met stappen van 0,4 TEU. In de IgM-bepaling bleek er een duidelijke caesuur te bestaan tussen $TEU = -0,8$ en $-0,4$; in dit traject bevond zich in de leeftijdsgroep van 0-15 jaar slechts 1 serum (tegen 9 in het traject tussen $TEU = -1,2$ en $-0,8$, en 8 in dat tussen $TEU = -0,4$ tot $0,0$). Dit zou wijzen op een grens tussen $TEU = -0,4$ en $-0,8$. Een neonaat toonde echter een waarde van $-0,3$ TEU. Wij hebben daarom een voorlopige grens voor IgM-antistoffen gelegd bij $TEU = -0,2$ ($0,87$ E.U.). De wijze waarop een definitieve grens werd gelegd, is hieronder weergegeven.

De grens voor IgG-antistofwaarden lag ook tussen $TEU = -0,8$ en $-0,4$. Hier was de caesuur niet zo scherp als voor de IgM-antilichamen; in dit traject werden 9 sera gevonden, tegen 9 in het traject van $TEU = -1,2$ tot $-0,8$ en 15 in het traject van $TEU = -0,4$ tot $0,0$. In de leeftijdsgroep boven 20 jaar werden geen waarden lager dan $TEU = -0,2$ vastgesteld. Wij besloten een voorlopige grens voor IgG-antistoffen te leggen bij $TEU = -0,5$ ($0,71$ E.U.).

Voor een nauwkeuriger bepaling van de grenzen voor IgM- en IgG-antistoffen hebben wij de volgende berekeningen uitgevoerd, waarbij gebruik werd gemaakt van de voorlopige grenzen en van grenzen die 1 TEU hoger lagen. In de discussie (9.3.) wordt de achtergrond van deze berekeningen toegelicht. Van elke leeftijdsgroep werden de meetkundige gemiddelden berekend van de antistoftiters van de -als negatief geklassificeerde- sera met een aantal E.U. tussen

0,25 E.U. (TEU = -2) enerzijds en de twee grenzen (voorlopige grens en grens die 1 TEU hoger ligt, dus respectievelijk TEU = -0,2 en 0,8 voor IgM-antistoffen en TEU = -0,5 en 0,5 voor IgG-antistoffen) anderzijds. Verder werd voor iedere leeftijdsgroep de relatieve frequentie berekend van de positieve sera, die bij elk van deze grenzen behoort. Met behulp van de correlatietoets van Spearman hebben wij nagegaan of er voor de verschillende leeftijdsgroepen een correlatie bestond tussen de bovengenoemde gemiddelden en de relatieve frequentie van positieve sera. Dit bleek het geval te zijn voor IgM-antistoffen, zowel bij de grens TEU = -0,2 ($R = 0,82$, $n = 12$) als bij de grens TEU = 0,8 ($R = 0,89$, $n = 13$). Voor IgG-antistoffen was dit niet het geval bij de grens TEU = -0,5 ($R = 0,04$, $n = 7$), wel bij de grens TEU = 0,5 ($R = 0,83$, $n = 12$).

Op grond van deze bevindingen besloten wij de (definitieve) grens voor IgM-antistoffen bij TEU = -0,2 (0,87 E.U.) te leggen, voor IgG-antistoffen bij TEU = 0,5 (1,41 E.U.). De met deze grenzen bepaalde relatieve frequentie van positieve sera per leeftijdsgroep en het bijbehorende meetkundige gemiddelde van het aantal E.U., met inbegrip van de standaardafwijking (± 1 maal) van het gemiddelde, zijn weergegeven in Fig. 9.4. voor IgM-antistoffen en Fig. 9.5. voor IgG-antistoffen.

In de leeftijdsgroepen boven 20 jaar wordt bij deze grens (TEU = 0,5) een aantal sera als negatief voor IgG-antistoffen beschouwd. Op grond van de hierboven beschreven verdeling van de IgG-antistoftiters in deze leeftijdsgroepen -die geen top van zeer lage E.U.-waarden toont- mag men aannemen dat deze sera wel specifieke IgG-antistoffen bevatten, temeer daar in deze groep sera geen waarden lager dan 0,9 E.U. voorkwamen.

9.2.7. Verdeling van positieve sera naar geslacht

Wij gingen na of er verschillen waren in relatieve frequentie van positieve sera tussen mannen en vrouwen. De sera van kinderen van wie het geslacht niet bekend is, werden buiten beschouwing gelaten (157 in ELISA-IgG, 45 in ELISA-IgM, allen jonger dan 6 jaar). Tabel 9.3. geeft een samenvatting van de verdeling van

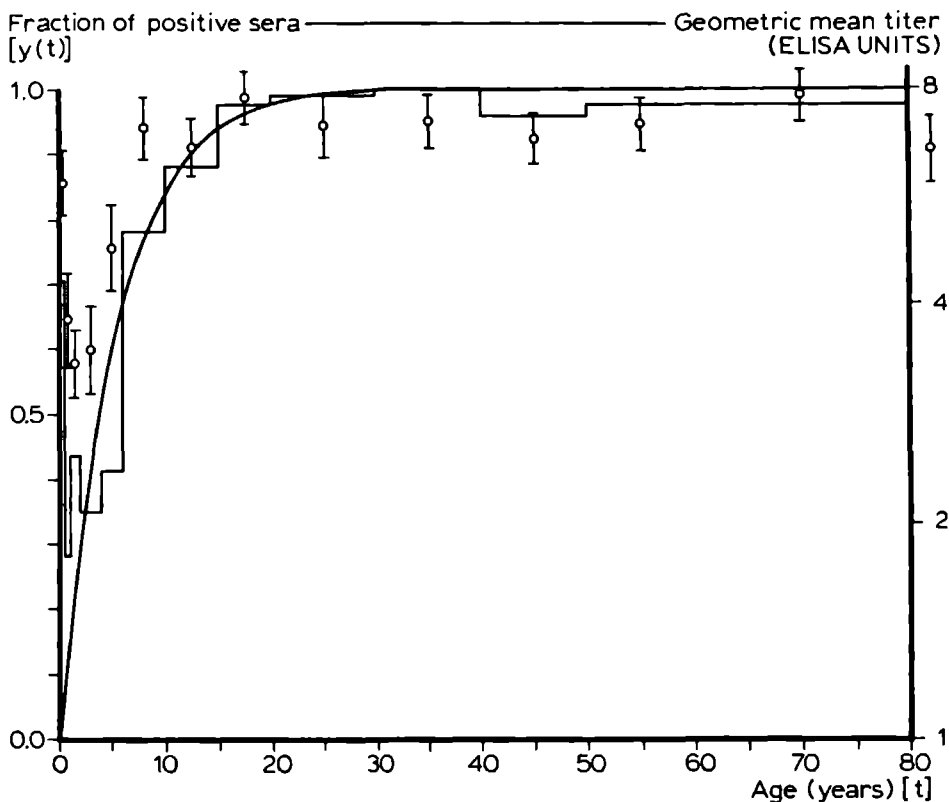


Fig. 9.5. Onderzoek van 1108 sera in ELISA-IgG

Per leeftijdsgroep zijn de relatieve frequenties (fracties) van positieve sera weergegeven en het meetkundig gemiddelde ($\pm 1 \times$ de standaardafwijking van het gemiddelde) van het aantal E.U. van de positieve sera. De katalytische curve: $y(t) = 1 - e^{-0,18t}$ is ingetekend.

Tabel 9.3. Verdeling van positieve sera naar geslacht

a. ELISA-IgM: sera van vrouwen						sera van mannen				
Leeftijd	n	pos. ¹	(%)	TEU ²		n	pos. ¹	(%)	TEU ²	
				Gem.	S				Gem.	S
0-½	5	0	(0)	--	-	10	0	(0)	--	-
½-3	12	12	(100)	1,66 ³	0,20	17	12	(70)	0,68 ³	0,14
4-14	26	23	(88)	1,69	0,17	27	25	(93)	1,42	0,18
15-39	31	28	(90)	1,29	0,20	27	21	(78)	1,89	0,32
≥40	40	25	(63)	1,31	0,18	31	12	(39)	1,16	0,27
Totaal	114	88	(77)	1,45	0,10	112	70	(63)	1,39	0,13
b. ELISA-IgG										
0-½	29	22	(76)	2,68	0,24	41	29	(71)	2,48	0,26
½-3	46	19	(41)	1,92	0,30	76	27	(36)	1,92	0,20
4-14	119	87	(73)	2,70	0,12	108	71	(66)	2,68	0,13
15-39	139	138	(99)	2,87	0,09	122	120	(98)	2,88	0,12
≥40	141	134	(95)	2,62 ⁴	0,08	130	129	(99)	3,10 ⁴	0,10
Totaal	474	400	(84)	2,67	0,05	477	376	(79)	2,82	0,06

¹Positief: TEU ≥ -0,2 (0,87 E.U.) voor IgM-antilichamen

TEU ≥ 0,5 (1,41 E.U.) voor IgG-antilichamen

²Gemiddelde van de ²log E.U. (TEU) van positieve sera en standaardafwijking van het gemiddelde (S).^{3,4}Significant verschil (p < 0,001, Student's t-toets voor onafhankelijke steekproeven)

de positieve sera naar leeftijd en geslacht.

Zowel voor IgG- als voor IgM-antilichamen waren vrouwen vaker positief. Binnen de leeftijdsgroepen waren er echter geen significante verschillen. Opvallend is wel dat voor de leeftijdsgroepen tussen ½ en 4 jaar de gemiddelde titer van de meisjes bijna een tweevoud hoger was (TEU = 1,66 tegen TEU = 0,68; $p < 0,001$, Student's t-toets voor onafhankelijke steekproeven). Dit verschil in titer werd in alle 3 leeftijdsgroepen tussen ½ en 4 jaar gevonden. Het enige andere significante verschil tussen mannen en vrouwen is de hogere gemiddelde titer in ELISA-IgG van mannen boven 40 jaar. Dit blijkt samen te hangen met een hogere frequentie van sterk verhoogde titers (>16 E.U.) bij mannen boven 50 jaar (23/83 tegen 3/92 bij vrouwen; $p < 0,001$, χ^2 -toets). Wij komen hierop in Hoofdstuk 10 terug.

9.2.8. Onderzoek van sera uit 1979

Van sera uit 1979 werd een groep van 120 sera van de leeftijdsgroep 4 en 5 jaar onderzocht in ELISA-IgM en -IgG. De resultaten werden vergeleken met die van de sera van dezelfde leeftijdsgroep uit 1977. Omdat er geen verschil was in frequentie van IgM- en IgG-antistoffen en in titerhoogte tussen sera die in de eerste en tweede helft van 1977 waren afgenomen (vergelijk 9.2.1.) en dit ook werd gevonden voor de sera van 1979, werden de resultaten voor ieder jaar tesamen weergegeven. Tabel 9.4. laat zien dat er, wat IgM-antistoffen betreft, slechts geringe (niet significante) verschillen in frequentie van positieve sera en in de gemiddelde antistoftiter (E.U.) voorkwamen tussen sera uit 1977 en 1979. IgG-antistoffen kwamen in 1979 vaker voor dan in 1977, voorzover het 5-jarige kinderen betrof. Zowel bij 4- als 5-jarigen was de gemiddelde IgG-antistoftiter hoger. In Hoofdstuk 10 wordt op de betekenis van deze verschillen nader ingegaan.

Tabel 9.4. Resultaten van ELISA-IgM en -IgG voor *M. pneumoniae* van sera van 4- en 5-jarigen uit 1977 en 1979

a. ELISA-IgM: sera uit 1977						sera uit 1979				
Leeftijd	n	pos. ¹	(%)	TEU ²		n	pos. ¹	(%)	TEU ²	
				Gem.	S				Gem.	S
4 jaar	7	6	(86)	--	-	73	55	(75)	1,84	0,21
5 jaar	14	13	(93)	--	-	47	38	(80)	1,52	0,16
Totaal	21	19	(90)	1,52	0,21	120	93	(78)	1,71	0,14
b. ELISA-IgG										
4 jaar	35	14	(40)	2,59	0,18	73	25	(34)	3,45	0,29
5 jaar	47	20	(43) ³	2,05	0,17	47	29	(61) ³	3,74	0,26
Totaal	82	34	(41)	2,27	0,13	120	54	(45)	3,70	0,19

¹Positief: TEU \geq 0,2 (0,87 E.U.) voor IgM-antilichamen

TEU \geq 0,5 (1,41 E.U.) voor IgG-antilichamen

²Gemiddelde van de ²log E.U. (TEU) van positieve sera en standaardafwijking van het gemiddelde (S)

³Significant verschil ($p = 0,03$, χ^2 -toets)

Voor het onderzoek werden sera gebruikt van patiënten, bij wie een vermoeden op toxoplasmose bestond. Aangezien *M. pneumoniae* luchtweginfecties veroorzaakt en toxoplasmose andere ziektebeelden, lijkt het weinig waarschijnlijk dat er verband zou bestaan tussen de reden van inzenden en het bestaan van een infectie met *M. pneumoniae*. Dit stemt overeen met onze bevindingen. Van alle onderzochte sera was er slechts één met hoge IgG- en IgM-antistoftiters die zouden kunnen wijzen op een recente infectie (zie Fig. 9.2. en 9.3., 20-29 jaar). Verder bleek er geen samenhang te bestaan tussen de aanwezigheid en titer van antistoffen tegen toxoplasma en die van antistoffen tegen *M. pneumoniae*. Het lijkt dus aannemelijk dat de gegevens van dit onderzoek een goed beeld geven van de situatie onder de gehele bevolking van de regio.

Binnen de gekozen studiepopulatie werd, zoveel mogelijk volgens aselechte procedures, een onderzoeksgroep samengesteld. Op de volgende punten was de keuze niet aselekt. Binnen iedere leeftijdsgroep werden de sera in alfabetische volgorde naar de naam van de desbetreffende patiënten geselecteerd. Van alle patiënten werd, ongeacht of er in een voorgaand jaar al serum was ingezonden, het eerste beschikbare serum onderzocht. Voor een deel waren dit -vooral in de eerste maanden van het jaar- herhalingssera. Hierdoor en omdat -achteraf- geïnactiveerde sera werden uitgesloten waardoor vooral sera van januari en februari uitvielen, waren de sera niet gelijkmatig over de maanden van het jaar verdeeld. De verschillen in frequentie van positieve sera voor IgG- en IgM-antistoffen tussen sera uit de eerste en tweede helft van het jaar waren echter minimaal, zodat aangenomen mag worden dat de resultaten ondanks de ongelijkmatige verdeling van de onderzochte sera representatief zijn voor de situatie in 1977.

Uit de proeven met de positieve referentiesera blijkt dat de reproduceerbaarheid goed is. Dit geldt voor de proeven met het eigen antigeen, in mindere mate voor die met Orion-antigeen. Het valt op dat de reproduceerbaarheid binnen de assay niet veel beter is dan die tussen de assays. De maximale verschillen tussen

2 bepalingen binnen één assay (met het eigen antigeen) bedragen minder dan één TEU, hetgeen, gezien de aantallen bepalingen, betekent dat een 2-voudig verschil in E.U. binnen een assay als significant mag worden beschouwd. Opvallen is ook de goede overeenkomst van de resultaten van de proeven met positieve referentiesera in de assays met sera uit 1977 en 1979, ondanks het feit dat verschillende batches conjugaat waren gebruikt.

De goede correlatie tussen de resultaten van proeven met eigen en Orion-antigeen -dat vrij is van glycolipiden (Räisänen *et al.*, 1980)- wijst er op dat eventuele kruisreacties van het eigen antigeen met antistoffen tegen plantaardige glycolipiden (Kenny en Newton, 1973) geen of in ieder geval geen belangrijke oorzaak zijn van positieve resultaten. Met Orion-antigeen werden lagere antistoftiters gevonden dan met eigen antigeen. De oorzaak hiervan zou kunnen zijn dat het Orion-antigeen gezuiverd is van glycolipiden, die de belangrijkste antigene component van *M. pneumoniae* zouden zijn (Plackett *et al.*, 1969). De zuivering zou ook de oorzaak kunnen zijn van de slechtere reproduceerbaarheid van de proeven met Orion-antigeen. Aan de andere kant moet er op worden gewezen dat wij slechts globaal onderzoek hebben gedaan naar de optimale condities voor de proeven met Orion-antigeen, in het bijzonder wat betreft de verdunningsvloeistoffen van sera en conjugaat.

Een onverwacht groot aantal sera toonde een positieve reactie in ELISA-IgM, zij het dat de titers laag waren. Voor epidemiologische analyse van de resultaten (zie Hoofdstuk 10) is het uiteraard van belang zorgvuldig na te gaan of deze resultaten specifiek zijn en waar de grens tussen positief en negatief het beste gelegd kan worden.

Uit de in Hoofdstuk 5 tot en met 8 beschreven onderzoeken blijkt dat de door ons toegepaste ELISA inderdaad specifiek is voor *M. pneumoniae* en voor de onderzochte klassen antilichamen, respectievelijk IgG en IgM. Ten aanzien van de specificiteit van ELISA-IgM voor IgM-antilichamen kan nog worden aangevoerd dat de frequentie van positieve sera boven de leeftijd van 30 jaar afneemt, terwijl men in het algemeen aanneemt dat de frequentie van specifieke reacties juist toeneemt met de leeftijd.

Bij de bepaling van de grens tussen positief en negatief valt

het allereerst op dat er voor ELISA-IgM een goede overeenstemming bestaat tussen de grens die op basis van de frequentieverdeling werd gevonden ($TEU = -0,4; 0,75$ E.U.) en de grens die werd gevonden bij vergelijking van de activiteit van controle-antigeen met die van het *M. pneumoniae*-antigeen ($0,7-1,0$ E.U., zie 5.3.). Voor ELISA-IgG ligt de grens op basis van de frequentieverdeling iets lager ($0,75$ E.U.) dan de grens die in 5.3. werd gevonden ($1-2$ E.U.).

Om de grens nauwkeurig te bepalen hebben wij de gemiddelde titer van een deel van de negatieve sera, namelijk negatieve sera met een relatief hoge extinctie (meer dan $0,25$ E.U.) vergeleken met de relatieve frequentie van positieve sera. De volgende redenering lag hieraan ten grondslag. Als de grens positief-negatief hoog gelegd wordt, zal een deel van de positieve sera ten onrechte tot de negatieve sera gerekend worden. Dit aantal zal -mits de verdeling van de titers van de positieve sera in de verschillende leeftijdsgroepen ongeveer gelijk is- groter zijn naarmate er in de leeftijdsgroepen meer positieve sera zijn. Omdat de gemiddelde titer van deze "fout-negatieve" sera hoger zal liggen dan die van de "werkelijk" negatieve, zal de gemiddelde titer van de als negatief geklassificeerde sera stijgen met de relatieve frequentie van de positieve sera. In plaats van het gemiddelde van alle negatieve sera werd het gemiddelde genomen van de negatieve sera met meer dan $0,25$ E.U., omdat onder deze grens de uitkomsten in E.U. onnauwkeurig zijn, en voor een deel (negatief aantal E.U.) in een logaritmische berekening niet hanteerbaar zijn. De bovengenoemde redenering blijft dan geldig, aangenomen dat in alle leeftijdsgroepen de verdeling van de negatieve sera naar aantal E.U. gelijk is. Wij vonden een positieve correlatie tussen de gemiddelde titer van de als negatief geklassificeerde sera (met meer dan $0,25$ E.U.) en de relatieve frequentie van positieve sera bij de grenzen $TEU = -0,2$ voor IgM-antistoffen en $TEU = 0,5$ voor IgG-antistoffen. Men moet dus aannemen dat bij deze grenzen een aantal positieve sera ten onrechte als negatief wordt beschouwd. Hier staat tegenover dat het niet uit te sluiten is, dat bij deze grenzen een aantal negatieve sera fout-positief wordt ingedeeld. Gezien de frequentieverdeling lijkt het onwaarschijnlijk dat deze aantallen groot zijn. Bovendien moet men reke-

ning houden met "bijzondere" aspecifieke reacties, zoals de fout-positieve uitkomsten die in ELISA-IgM door rheuma-factor kunnen worden veroorzaakt (5.7.). Voor onderzoeken naar prevalentie acht men het optimaal, dat fout-positieve en fout-negatieve reacties elkaar in evenwicht houden (Rose en Barker, 1978). Hoewel het niet precies is vast te stellen waar de grens ligt, waarbij dit het geval is, lijkt de optimale situatie goed benaderd te worden door bovengenoemde grenzen te hanteren.

9.4. CONCLUSIE

Sera van 1437 personen werden met ELISA-IgG en van 360 personen met ELISA-IgM op antilichamen tegen *M. pneumoniae* onderzocht. Proeven met positieve controlesera toonden aan dat de uitkomsten van ELISA-IgG en -IgM goed reproduceerbaar waren. Sera, die geïnactiveerd waren (22,9%) bleken afwijkende uitkomsten op te leveren; deze werden bij de bewerking van de resultaten uitgesloten. De overige sera toonden een goede correlatie tussen de resultaten van proeven met eigen en Orion-antigeen. Dit wijst er op dat kruisreacties van eigen antigeen met plantaardige glycolipiden geen belangrijke invloed op de resultaten hebben. Op grond van een aantal overwegingen en berekeningen werd een bepaalde grens vastgesteld voor de scheiding van positieve en negatieve sera. De grens voor ELISA-IgM lag bij 0,87 E.U. (TEU = -0,2) en die voor ELISA-IgG bij 1,4 E.U. (TEU = 0,5).

EPIDEMIOLOGIE VAN MYCOPLASMA PNEUMONIAE-INFECTIE

In dit hoofdstuk beschrijven wij eerst zowel voor IgG-antilichamen als voor IgM-antilichamen, het patroon van relatieve frequenties van seropositieve personen per leeftijdsgroep (kortweg aan te duiden als: het patroon). Vervolgens zullen wij met behulp van mathematische modellen het waargenomen patroon trachten te verklaren en berekeningen uitvoeren om het aantal besmettingen (deze term wordt hieronder, 10.2., gedefinieerd) per jaar te bepalen. Hiervoor maken wij gebruik van de modellen van Muench (1959). Omdat het door ons gevonden patroon voor IgG-antilichamen niet goed met de modellen van Muench verklaard kan worden, hebben wij getracht een mathematisch model op te stellen, dat het waargenomen patroon beter verklaart.

10.1. *BESCHRIJVING VAN DE WAARGENOMEN PATRONEN*

In het vorige hoofdstuk zijn de relatieve frequenties van sero-positieve personen per leeftijdsgroep berekend. Door middel van twee reacties, ELISA-IgM en ELISA-IgG, werden positieve sera opgespoord. De uitkomsten waren niet gelijk.

Het patroon van IgM-antilichamen (Fig. 9.4., Fig. 10.1.) toont een snelle stijging tot de leeftijd van ongeveer 5 jaar. Daarna blijft de relatieve frequentie van positieve sera ongeveer constant op een niveau van 0,9, tot de leeftijd van 30 jaar. Vervolgens treedt een geleidelijke daling op, zodanig dat bij personen boven 60 jaar in ongeveer 40% van de onderzochte sera IgM-antilichamen werden aangetoond.

In ELISA-IgG (Fig. 9.5., Fig. 10.2.) is in de eerste levensmaanden de frequentie van -moederlijke- antilichamen hoog. Vanaf de leeftijd dat deze zijn verdwenen (in de loop van het eerste halve levensjaar), zien we een stijging van de relatieve frequentie, die iets minder steil is, dan die in ELISA-IgM werd gevonden, tot een top van bijna 0,5 op 2-jarige leeftijd. Daarna is de re-

latieve frequentie tot 5-jarige leeftijd ongeveer constant op een wat lager niveau (ongeveer 0,35). Vervolgens treedt een -aanvaankelijk, tussen 5½- en 7-jarige leeftijd, sterke- toename van het aantal positieve sera op (de sera van 1979 tonen een dergelijke sterke toename tussen 4- en 5-jarige leeftijd, Tabel 9.4.). Ten slotte toont het patroon een geleidelijke stijging totdat, vanaf ongeveer 20-jarige leeftijd, vrijwel alle sera positief zijn.

Vergelijking van de resultaten in ELISA-IgG en -IgM laat zien dat in de leeftijdsgroepen tot 8 jaar de frequentie van IgM-antilichamen hoger is dan die van IgG-antilichamen. Dit is opmerkelijk omdat IgM-antilichamen na een infectie meestal korter aantoonbaar blijven dan IgG-antistoffen; men zou dus juist het omgekeerde verwachten.

10.2. BEREKENINGEN MET DE MODELLEN VAN MUENCH

Zoals door Muench (1959) werd beschreven, kan men met behulp van katalytische modellen een verklaring geven voor patronen, die men in sero-epidemiologische onderzoeken kan waarnemen. Hij gaat uit van een -voor alle leeftijden- constant aantal besmettingen per jaar. Onder besmettingen worden in dit verband verstaan, die besmettelijke contacten (effectieve besmettelijke contacten), die -bij vatbare (niet-immune) personen- tot een infectie aanleiding geven. In onze situatie betrekken we alleen infecties waarbij antistoffen tegen het infectieuze agens (in ons geval *M. pneumoniae*) geïnduceerd worden (besmettingen, die niet tot seroconversie aanleiding geven, worden buiten beschouwing gelaten). Als maat voor de besmettingsintensiteit gebruikt Muench de "infection rate", weergegeven met de parameter a . De "infection rate" of infectiedruk is het gemiddelde aantal besmettingen -als hierboven gedefinieerd- per individu per jaar.

Uitgaande van de constante infectiedruk a heeft Muench verschillende katalytische modellen opgesteld. De drie modellen, die voor ons onderzoek van belang zijn, verschillen met betrekking tot het wel of niet persisteren van antistoffen na een infectie en het wel of niet ontstaan van blijvende immuniteit na een infectie.

Het eerste model gaat er vanuit dat na een infectie levenslang antistoffen aantoonbaar blijven. De relatie tussen de relatieve frequentie van seropositieve personen $y(t)$, en de leeftijd t , kan worden weergegeven door de volgende formule:

$$y(t) = 1 - e^{-at} \quad (1)$$

waarin: $y(t)$ = relatieve frequentie van seropositieve personen op leeftijd t

a = infectiedruk

t = leeftijd

De functie $y(t)$ beschrijft een curve, die asymptotisch tot 1 nadert (zie bv. de curve in Fig. 9.5.). Met deze formule kan men berekenen dat bij een infectiedruk van 0,7, na het eerste jaar slechts 0,5 deel van de bevolking een infectie zal hebben doorgeemaakt; de infectiekans per jaar bedraagt in dit geval dus 0,5. Dit hangt samen met het feit dat gedurende het jaar het aandeel van de vatbare -c.q. seronegatieve personen- waarop de infectiedruk inwerkt, kleiner wordt.

Het tweede model gaat er vanuit dat antistoffen na een infectie weer verdwijnen -d.w.z. niet meer aantoonbaar zijn, "negatieve seroconversie"- en dat ook de immuniteit daarbij verdwijnt (seronegatieve personen zijn dus weer vatbaar). Als parameter voor het tempo van negatieve seroconversie gebruikt Muench de -constante- "reversion rate" b , die zo gekozen is, dat $1/b$ overeenkomt met de gemiddelde tijdsduur waarin antilichamen na een infectie aantoonbaar zijn. De relatie tussen de relatieve frequentie van seropositieve personen $y(t)$ en de leeftijd t kan nu worden weergegeven met de formule:

$$y(t) = \frac{a}{a + b} (1 - e^{-(a + b)t}) \quad (2)$$

waarin: b = "reversion rate": parameter voor het tempo van negatieve seroconversie

Deze functie beschrijft een curve ("reversible catalytic curve", Muench) die asymptotisch tot een waarde $a/(a + b)$ (dus kleiner dan 1) nadert (zie bv. Fig. 10.1., curve 2).

Het derde model gaat ervan uit dat antistoffen na een infectie weliswaar verdwijnen, met een constante "reversion rate" b ,

maar dat immuniteit tegen reïnfectie blijft bestaan (deze immuniteit hangt dus niet samen met het aantoonbaar zijn van de betreffende antilichamen). De relatie tussen de relatieve frequentie $y(t)$ en de leeftijd t kan nu worden weergegeven met de formule:

$$y(t) = \frac{a}{a - b} (e^{-bt} - e^{-at}) \quad (3)$$

Deze functie beschrijft een curve ("two stage catalytic curve", Muench), die tot een hoogste punt, kleiner dan 1, stijgt en vervolgens asymptotisch tot 0 daalt (zie bv. de curve in Fig. 9.4.). De afleiding van deze formules is door Muench (1959) gegeven.

Het is mogelijk met behulp van deze modellen de infectiedruk a en de "reversion rate" b (en de periode $1/b$, waarin antilichamen na een infectie aantoonbaar zijn) te berekenen. Muench beschreef voor de berekening van a en b een methode, waarbij men gebruik maakt van nomogrammen. In onze studie zijn de parameters a en b met behulp van gewogen, niet-lineaire regressie berekend, met als meetpunten de relatieve frequentie van positieve sera en het klassemidden van elke leeftijdsklasse. Die modellen werden voor de berekeningen gebruikt, waarvan de curve volgens bovenstaande beschrijving overeenkwam met het waargenomen patroon. In de berekening werden de meetpunten van de jongste leeftijdsklasse niet betrokken: in ELISA-IgG vanwege de aanwezigheid van moederlijke antilichamen en in beide onderzoeken omdat de leeftijdsverdeling binnen deze klasse niet homogeen was.

Voor de meetpunten in ELISA-IgM tussen 0,5 en 30 jaar werden de curven berekend met behulp van de formules (2) en (3) (Tabel 10.1., Fig. 10.1.) en met model (3) voor meetpunten tussen 0,5 en 60 jaar (Tabel 10.1., Fig. 9.4.). Model (2) blijkt voor de lagere leeftijden een betere aanpassing te geven; de infectiedruk a bedraagt volgens dit model 0,90; antilichamen zouden gemiddeld 10 jaar aantoonbaar zijn. Als men ook de leeftijdsgroepen tot 60 jaar in de berekening betreft, kan alleen model (3) een goede aanpassing geven; de infectiedruk is dan 0,75 en de antilichamen zouden gemiddeld 110-140 jaar aantoonbaar blijven. Wij hebben voor de meetpunten in ELISA-IgM ook curven berekend, op basis van de veronderstelling, dat kinderen tot $\frac{1}{2}$ jaar immuun zouden zijn.

Tabel 10.1. Serologisch onderzoek bij personen van verschillende leeftijdsklassen door middel van ELISA-IgM

a. Parameters voor de katalytische curven, berekend voor verschillende leeftijdsgroepen met behulp van gewogen niet-lineaire regressie.

<u>Leeftijd</u> (jaar)	<u>Model</u> ¹	<u>Meeptunten</u> aantal	<u>Infectedruk</u> ² a	<u>"reversion rate"</u> ³ b	<u>Daar seropositiviteit</u> <u>na infectie</u> (1/b)	<u>Residuele</u> <u>kwadraten</u>
0,5 - 30	(2)	8	0,90 ± 0,10	0,10 ± 0,02	10 jaar	1,4
0,5 - 30	(3)	8	0,75 ± 0,10	0,007 ± 0,002	140 jaar	3,6
0,5 - 60	(3)	11	0,75 ± 0,11	0,009 ± 0,002	110 jaar	(10,2)

b. Waargenomen en met behulp van de katalytische modellen berekende frequenties per leeftijdsgroep (model (2)¹ 0,5 - 30 jaar, model (3)¹ 0,5 - 60 jaar).

<u>Groep</u>	<u>Leeftijd</u> (jaar)	<u>t</u> ³	<u>Aantal sera</u>		<u>Waargenomen relatieve</u> <u>frequentie</u>	<u>Berekende relatieve frequentie</u>	
			<u>pos.</u>	<u>tot</u>		(2) ¹	(3) ¹
1	0-0,5	0,25	1	24	0,04	0,19	0,17
2	0,5-1	0,75	9	19	0,47	0,47	0,43
3	1	1,5	18	25	0,72	0,70	0,67
4	2-3	3,0	16	20	0,80	0,85	0,88
5	4-5	5,0	19	21	0,90	0,89	0,94
6	6-9	8,0	16	18	0,89	0,90	0,94
7	10-14	12,5	15	16	0,94	0,90	0,90
8	15-19	17,5	15	18	0,83	0,90	0,86
9	20-29	25,0	18	20	0,90	0,90	0,81
10	30-39	35,0	16	20	0,80	—	0,74
11	40-49	45,0	16	26	0,62	—	0,68
12	50-59	55,0	12	23	0,52	—	0,62
13	>60	—	9	22	0,41	—	—

¹De cijfers tussen haakjes verwijzen naar de formules in de tekst.

²Berekende waarden en standaardafwijking.

³Klasseniiden.

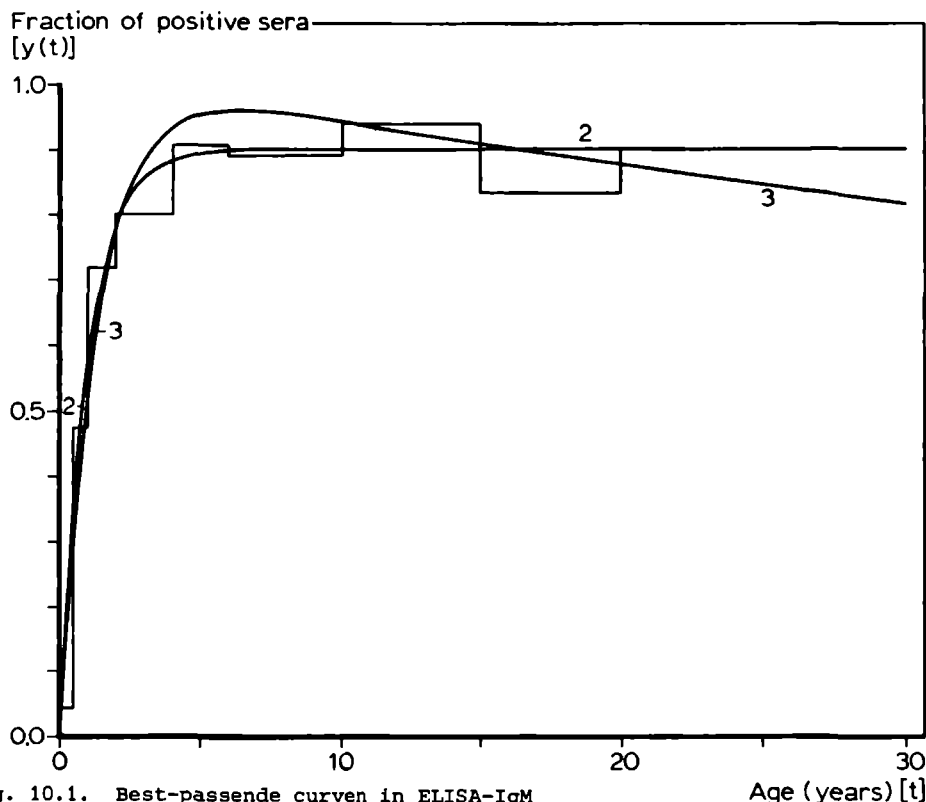


Fig. 10.1. Best-passende curven in ELISA-IgM

De fracties van seropositieve personen in de leeftijdsgroepen tot 30 jaar zijn weergegeven. Ingetekend zijn de curven volgens model (2) en volgens model (3). De bijbehorende parameters a en b worden gegeven in Tabel 10.1.a.

Dit resulteerde voor beide modellen in slechtere aanpassingen.

Voor de berekeningen van IgG-antilichamen hebben wij de leeftijdsgroepen onderverdeeld (zie Tabel 10.1.). De relatieve frequentie van seropositieve personen nadert tot 1; dit zou pleiten voor een aanpassing volgens model (1). Omdat model (2) (evenals model (3)) overgaat in model (1) als de parameter b gelijk is aan 0, kozen wij voor model (2). Hierdoor waren wij in staat de hypothese $-b = 0-$ te toetsen d.w.z. de hypothese dat antilichamen na infectie levenslang aantoonbaar blijven. De uitkomsten van de modelaanpassing voor meetpunten tussen $\frac{1}{2}$ en 30 jaar volgens model

(2) zijn gegeven in Tabel 10.2., de curve is weergegeven in Fig. 9.5. De berekende parameter b verschilt niet significant van 0. Hieruit zou men kunnen afleiden dat IgG-antilichamen levenslang aantoonbaar blijven.

Het valt echter op dat de infectiedruk (0,18) veel lager is dan die (0,75 - 0,9) volgens de berekeningen voor IgM-antilichamen. Bovendien is de aanpassing van de curve voor IgG-antilichamen slecht voor leeftijden tot 6 jaar; voor 3 groepen ($\frac{1}{2}$ -1; 1-1 $\frac{1}{2}$ en 5 jaar) ligt de curve niet binnen het 99% betrouwbaarheidsinterval van de waargenomen relatieve frequenties. De eenvoudige katalytische modellen (1) en (2) geven de relatie tussen leeftijd en relatieve frequenties van positieve sera voor IgG-antilichamen dus niet goed weer.

10.3. MODEL MET PRIMAIRE EN SECUNDAIRE INFECTIES

In de volgende beschouwing hebben wij getracht een aanzet te geven tot een mogelijke verklaring van het gevonden patroon voor IgG-antilichamen. Deze verklaring berust op een aantal (5) veronderstellingen, die ontleend zijn aan de epidemiologie en immuniteit van *M. pneumoniae*-infecties.

1. We gaan ervan uit dat in de epidemiologie van *M. pneumoniae*-infecties twee soorten besmettingen kunnen worden onderscheiden, die wij aanduiden als lichte en zware besmettingen. Een zware besmetting is een besmetting met een -gemiddeld- grotere dosis *M. pneumoniae* dan een lichte besmetting.

2. We veronderstellen, dat na een primaire infectie -hetzij door een lichte, hetzij door een zware besmetting- (partiële) immuniteit ontstaat, terwijl IgG-antistoffen verdwijnen. Secundaire infecties kunnen -door de aanwezige immuniteit- niet ontstaan en induceren derhalve niet opnieuw antistoffen. Tot zover komen de veronderstellingen overeen met die van het bovengenoemde model (3) volgens Muench.

3. We veronderstellen echter bovendien dat de door de primaire infectie opgewekte immuniteit alleen bescherming biedt tegen secundaire infecties tengevolge van een lichte besmetting. Tengevolge van een zware besmetting kan de immuniteit worden doorbro-

ken, zodat zich wel een secundaire infectie ontwikkelt, onder vorming van antistoffen.

4. Verder veronderstellen we dat de serologische "respons" na secundaire infectie sterker is -tengevolge van een "boost" effect- dan die na een primaire en dat dientengevolge antistoffen na secundaire infectie persisteren en levenslang aantoonbaar blijven.

5. Wij gaan er tenslotte van uit dat de kans op een lichte besmetting op verschillende leeftijden -bij goede benadering- constant is, terwijl de kans op zware besmetting aanvankelijk geleidelijk toeneemt met de leeftijd en dat na verloop van tijd -op kleuterschoolleeftijd- een maximale constante infectiekans ontstaat.

In de literatuur zijn aanwijzingen die deze veronderstellingen steunen. In de eerste plaats ten aanzien van de doorbreking van de immuniteit tegen *M. pneumoniae*. Zo is het volgens Fernald *et al.* (1975) aannemelijk dat infecties die gepaard gaan met klinische symptomen, meestal zijn voorafgegaan door primaire "sensibiliserende infecties", die geen of slechts geringe ziekteverschijnselen veroorzaken. Verder hebben wij er in Hoofdstuk 1 (paragraaf: Transmissie) op gewezen dat voor het ontstaan van ziekte, in het bijzonder pneumonie, waarschijnlijk een grotere dosis *M. pneumoniae* nodig is dan voor infectie zonder noemenswaardige ziekteverschijnselen. De kans om met een grote dosis *M. pneumoniae* besmet te worden, zal toenemen naarmate het aantal contacten toeneemt in frequentie en intensiteit. Dit is vooral het geval op de kleuterleeftijd wanneer de kinderen op school aan intensieve besmetting door klasgenoten zijn blootgesteld. Op deze leeftijd wordt inderdaad de grootste frequentie van pneumonien door *M. pneumoniae* gevonden (Foy *et al.*, 1970). Dat secundaire infecties een krachtiger serologische "respons" opwekken dan de primaire infecties, stemt overeen met de algemene immunologische opvattingen hierover. Dit verschijnsel is bij vele virusinfecties waargenomen, evenals bij vaccinaties tegen bacteriële infectieziekten.

Op basis van bovengenoemde veronderstellingen werd een mathematisch model opgesteld. De parameters voor dit model werden verkregen door de volgende voorwaarden aan te nemen:

a. Wij nemen aan dat lichte besmettingen -als niet tevens een

zware besmetting is opgetreden- aanleiding geven tot primaire infecties met een constante infectiedruk a (deze infectiedruk door lichte besmettingen zal korthedshalve worden aangeduid als l -infectiedruk). Na deze primaire infecties verdwijnen de antilichamen met een constante "reversion rate" b . Omdat volgens bovengenoemde veronderstelling 2. immuniteit voor lichte besmettingen bestaat, wordt de relatieve frequentie van seropositieve personen, die geen zware besmettingen hebben ondergaan, op leeftijd t weergegeven door bovengenoemde formule (3) volgens Muench.

b. Ten aanzien van de zware besmettingen nemen wij aan dat deze statistisch onafhankelijk zijn van de lichte besmettingen. Nu worden drie situaties onderscheiden:

- 1 er is uitsluitend één zware besmetting opgetreden; wij nemen aan dat na infectie op deze wijze antilichamen gedurende een periode van $1/b$ jaar aantoonbaar zijn (even lang als gemiddeld na primaire infecties ten gevolge van lichte besmetting);
- 2 er zijn twee of meer zware besmettingen opgetreden: wij nemen aan dat dit heeft geresulteerd in een secundaire infectie, waarna sera blijvend positief zijn;
- 3 er is één zware en tenminste één lichte besmetting -ongeacht de volgorde- opgetreden: ook in dit geval nemen wij aan dat een secundaire infectie met blijvend aantoonbare antilichamen is opgetreden. Deze voorwaarde is -voorzover een lichte besmetting na een zware tot een secundaire infectie aanleiding geeft- niet geheel in overeenstemming met bovengenoemde veronderstellingen 2. en 3. Deze voorwaarde werd aangenomen ter vereenvoudiging van het mathematisch model; wij zullen hieronder trachten na te gaan in hoeverre hierdoor de resultaten volgens dit model afwijken van die met een model, dat geheel in overeenstemming is met de veronderstellingen (het "exacte" model).

c. Ten aanzien van de infectiedruk tengevolge van zware besmettingen (aangeduid als z -infectiedruk) nemen wij aan dat deze na verloop van tijd nadert tot een maximale constante infectiedruk (γ). Vervolgens nemen wij aan dat de met de leeftijd toenemende, z -infectiedruk goed wordt weergegeven door een symmetrisch logistische functie:

$$\lambda(t) = \gamma \frac{e^{\alpha(t-\beta)}}{1 + e^{\alpha(t-\beta)}} \quad (4)$$

waarin: $\lambda(t)$ = z-infectiedruk

t = leeftijd

γ = maximale (asymptotische) z-infectiedruk

β = leeftijd t , waarop $\lambda(t) = \frac{1}{2}\gamma$

α = parameter voor de steilheid van de curve;
op leeftijd $t = \beta$ is de hellingshoek gelijk
aan $\alpha\gamma$

Onder bovengenoemde voorwaarden kan, met behulp van kansberekening, worden afgeleid dat $p(t)$, d.i. de relatieve frequentie van seropositieve personen op leeftijd t , gegeven wordt door de volgende complexe formule:

$$\begin{aligned} p(t) &= 1 - e^{-\mu(t)} (1 - y(t)) && \text{voor } t \ll 1/b \\ p(t) &= 1 - e^{-\mu(t)} (1 - y(t) + (\mu(t) - \mu(d))e^{-at}) && \text{voor } t \gg 1/b \end{aligned} \quad (5)$$

waarin: $p(t)$ = relatieve frequentie van positieve personen
op leeftijd t

$y(t)$ = curve volgens (3) met parameters a en b

$$\mu(t) = \frac{\gamma}{\alpha} \left(\ln \frac{1 + e^{\alpha(t-\beta)}}{1 + e^{-\alpha\beta}} \right)$$

$$d = 1/b$$

(Het mathematische model (5) werd opgesteld door Drs. J.A.M. van Druten.)

De modelfunctie (5) heeft 5 parameters a , b , α , β en γ , waarvan de betekenis eerder in de tekst is gegeven. Door toepassing van gewogen (gesegmenteerde) niet-lineaire regressie (NLIN-procedure, Statistical Analysis System) is getracht deze curve aan te passen aan de meetpunten. Het blijkt dat het hier genoemde model (5) curven beschrijft, die overeenkomen met het waargenomen patroon voor IgG-antilichamen. Ofschoon de aanpassing aan de meetpunten redelijk is (zie Fig. 10.2.), zijn de schattingen van de parameters niet nauwkeurig, zoals onder meer blijkt uit het feit dat de

Tabel 10.2. Serologisch onderzoek bij personen van verschillende leeftijdsklassen door middel van ELISA-IgG

a. Parameters voor de "reversible catalytic curve" (2)¹ en van de curve volgens model (5)¹ met de kleinste residuele kwadraten (berekend over de leeftijden ½ - 30 jaar; aantal meetpunten = 15)

Model ¹	(1-)infectiedruk ²	"reversion rate" ²	Parameters ² voor 2-infectiedruk $\lambda(t)$ vlg. (4) ¹			Residuele kwadraten ³
	a	b	a	β	γ	
(2)	0,18 ± 0,03	-0,0005 ± 0,004	-	-	-	48,4
(5)	0,70 ± 0,20	0,66 ± 0,44	1,21 ± 2,6	3,5 ± 0,9	0,30 ± 0,07	11,8

b. Waargenomen en berekende relatieve frequenties van seropositieven per leeftijdsgroep. De met behulp van model (2)¹ en (5)¹ berekende relatieve frequenties zijn weergegeven, samen met de volgens (5)¹ berekende totale infectiedruk: $a + \lambda(t)$. De in tabel 10.2.a. gegeven waarden voor de parameters werden gebruikt bij de berekening.

Leeftijd	t	Aantal sera		Waargenomen rel. frequentie	Berekende rel. frequentie		Totale infectiedruk $a + \lambda(t)$ (5) ¹
		pos.	tot		(2) ¹	(5) ¹	
0,00-0,25	0,125	60	72	0,83	0,02	0,08	0,705
0,25-0,50	0,375	2	20	0,10	0,07	0,21	0,707
0,50-0,75	0,625	7	31	0,23	0,11	0,29	0,709
0,75-1,00	0,875	13	40	0,33	0,15	0,34	0,712
1,0-1,5	1,25	28	57	0,49	0,20	0,38	0,719
1,5-2,0	1,75	11	32	0,34	0,27	0,39	0,732
2	2,5	13	37	0,35	0,37	0,35	0,769
3	3,5	19	51	0,35	0,47	0,34	0,850
4	4,5	14	35	0,40	0,56	0,40	0,931
5	5,5	20	47	0,43	0,64	0,50	0,976
6-7	7,0	30	43	0,70	0,72	0,66	0,996
8-9	9,0	31	35	0,89	0,81	0,81	1,000 ⁴
10-11	11,0	30	37	0,81	0,87	0,89	1,000
12-15	14,0	51	53	0,96	0,92	0,96	1,000
16-19	18,0	55	57	0,96	0,97	0,99	1,000
20-30	25,0	94	95	0,99	0,99	1,00	1,000

¹De cijfers tussen haakjes verwijzen naar de formules in de tekst.

²Berekende waarde en standaardafwijking; de getallen voor model (5) gelden slechts bij benadering gezien de, in de tekst besproken problemen bij de aanpassing.

³De infectiedruk kan alle waarden boven 0 aannemen; afhankelijk van de meetpunten ook waarden groter dan 1; in dit geval naderde de infectiedruk asymptotisch tot 1,0003.

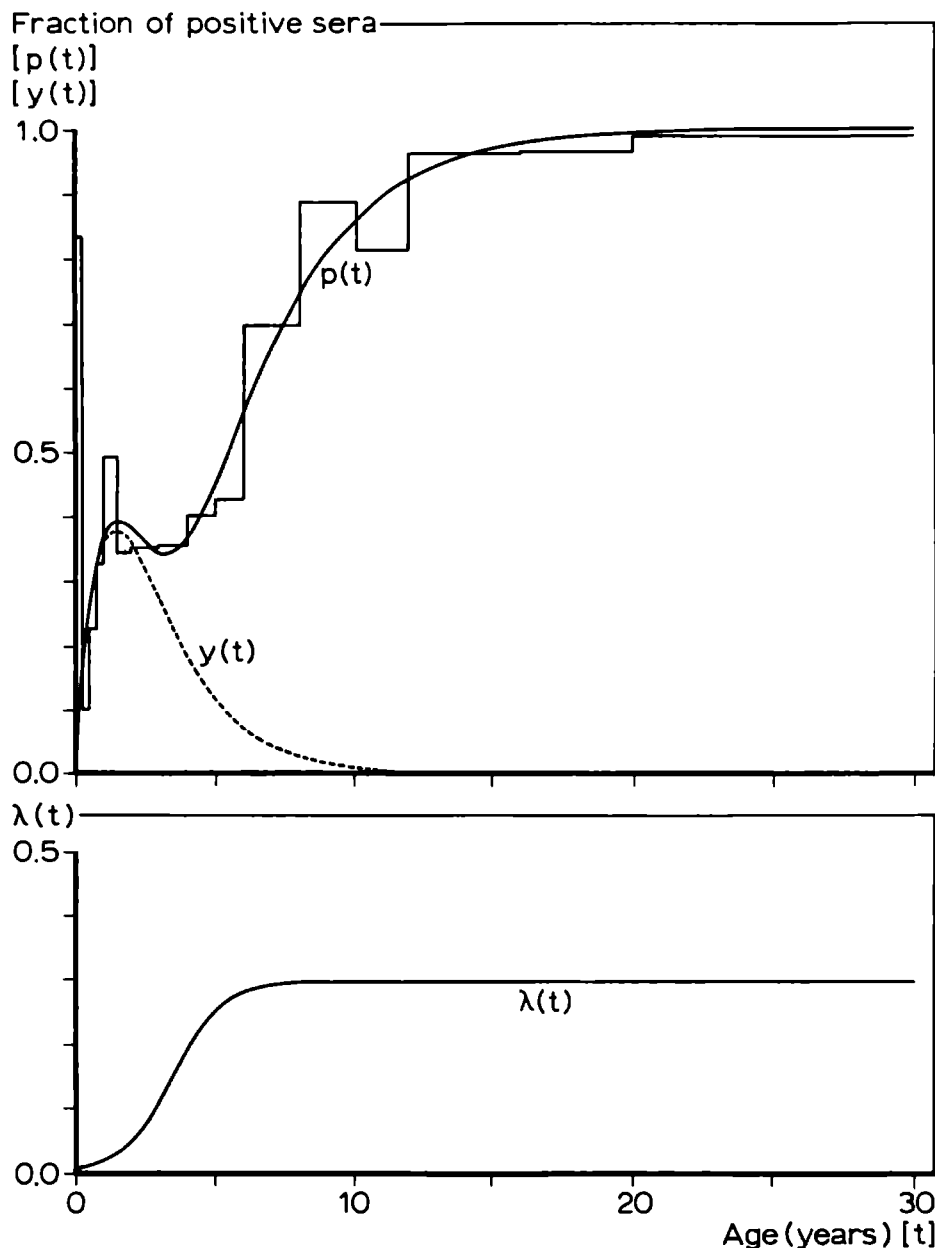


Fig. 10.2. Voorbeeld van een aanpassing volgens model (5) aan de resultaten in ELISA-IgG

De fracties van seropositieve personen in (onderverdeelde) leeftijdsgroepen tot 30 jaar zijn weergegeven. De volgende curven, met de parameters a , b , α , β en γ zoals weergegeven in Tabel 10.2.a., zijn weergegeven: $p(t)$ = curve volgens model (5); $y(t)$ = theoretisch curve volgens (3); $\lambda(t)$ = symmetrisch-logistische functie (4) (kans op z-besmetting)

modeloplossing afhankelijk is van de uitgangswaarden, die worden opgegeven voor de niet-lineaire regressie-berekening. Gezien deze aanpassingsproblemen -die mede veroorzaakt werden door het geringe aantal meetpunten- wordt hierna volstaan met een globale beschrijving van de resultaten.

Bij verschillende uitgangswaarden werden verschillende curven (modeloplossingen) gevonden. Hieronder worden van de curven met de beste aanpassingen (gemeten aan de residuele kwadraatsommen) de berekende waarden voor de parameters gegeven. Deze waarden lagen altijd binnen de 95%-betrouwbaarheidsgrenzen van de waarden die voor curven met minder goede aanpassingen werden gevonden.

Voor de 1-infectiedruk a werden waarden van 0,70 - 0,75 gevonden. De maximale z -infectiedruk γ bedroeg 0,28 - 0,30. De leeftijd $t = \beta$, waarop de z -infectiedruk het sterkst toeneemt, bedroeg 3,3 - 3,5 jaar. De andere 2 parameters waren minder nauwkeurig; de "reversion rate" b bedroeg 0,6 - 0,8 (IgG-antilichamen zouden dus ongeveer 1½ jaar na een primaire infectie aantoonbaar blijven) en de parameter voor de toename-snelheid van de z -infectiedruk α bedroeg 0,8 - 1,2. Als voorbeeld worden de curve (Fig. 10.2.) en de parameters en standaardafwijkingen (Tabel 10.2.) van de modeloplossing met de beste aanpassing (met de kleinste waarde van de som van de kwadratische residuen) gegeven. Deze curve ligt binnen de 95%-betrouwbaarheidsgrenzen van alle meetpunten.

10.4. ONDERZOEK VAN ANDERE MODELLEN MET PRIMAIRE EN SECUNDAIRE INFECTIES

Om na te gaan of de veronderstellingen, die aan model (5) ten grondslag liggen, noodzakelijk zijn, gingen wij na wat voor invloed het weglaten of vervangen van telkens één van deze veronderstellingen had. Nadat het mathematische model (5) overeenkomstig aangepast was, werd telkens getracht een curve volgens het gewijzigde model aan te passen. Meestal traden hierbij soortgelijke aanpassingsproblemen op als bij het oorspronkelijke model (5); hieronder wordt telkens de curve met de beste aanpassing vergeleken met de hierboven beschreven curve volgens model (5).

In de eerste plaats gingen we na wat het effect was van de

veronderstelling, dat na een primaire infectie geen immuniteit voor lichte besmettingen optreedt. In formule (5) moet $y(t)$ volgens formule (3) dan vervangen worden door $y(t)$ volgens formule (2). Met de zo gewijzigde formule (5a) traden dezelfde aanpassingsproblemen op als bij het oorspronkelijke model (5). De gevonden waarden voor de l-infectiedruk α (0,75) en voor de maximale z-infectiedruk γ (0,3 - 0,33) weken weinig af van de hierboven beschreven waarden. De waarden voor de overige parameters: b (1,15), α (11,1 - 13,3) en β (4,9 - 5,2) waren hoger. De beste curve toonde een ongeveer even goede, of iets betere aanpassing dan die van het oorspronkelijke model. Op mathematisch-statistische gronden kan men dus geen voorkeur uitspreken voor model (5a) of (5).

Op de volgende overwegingen geven wij toch de voorkeur aan het oorspronkelijke model (5). De curve van de z-infectiedruk $\lambda(t)$, die men met de parameters van (5a) kan berekenen, heeft een duidelijk ander verloop dan de curve in Fig. 10.2. Tot de leeftijd $t = \beta$ (ongeveer 5 jaar) blijft $\lambda(t)$ vrijwel gelijk aan 0; dan volgt een abrupte stijging tot een plateau dat vrijwel gelijk is aan de maximale z-infectiedruk γ (0,30 - 0,33). Het lijkt weinig waarschijnlijk dat een dergelijke abrupte stijging van de infectiedruk overeenkomt met het werkelijke verloop van de kans op zware besmettingen. Bovendien is de leeftijd (5 jaar) waarop deze stijging optreedt, hoger dan met het begin van de kleuterschoolleeftijd overeenkomt. Tenslotte treden volgens de uitkomsten van dit model een aantal secundaire infecties op -tengevolge van lichte besmettingen- die geen "booster" serologische respons opwekken; dit is in strijd met bovengenoemde immunologische opvattingen over secundaire infecties.

Hierna gingen we na of het waargenomen patroon ook verklaard kan worden op basis van de veronderstelling dat er slechts één soort infectie voorkomt (die in aard overeenkomt met infectie door zware besmetting) en dat deze soort infectie -met een met de leeftijd toenemende frequentie- zowel primaire als secundaire infecties veroorzaakt. Dit werd onderzocht door in model (5) de l-infectiedruk $a = 0$ te stellen (5b). Hiermee kon geen curve worden verkregen die goed overeenkwam met onze waarnemingen. Hiermee in overeenstemming is ook dat volgens de meeste modeloplossingen

van (5) -en ook van (5a)- de ondergrens van het betrouwbaarheidsinterval voor a boven 0 lag. Binnen het door ons beschreven model lijkt de veronderstelling van het bestaan van lichte besmettingen noodzakelijk.

Vervolgens hebben wij getracht na te gaan of kan worden aangenomen dat de z -infectiedruk constant is. Onder handhaven van de overige voorwaarden, ontstond een eenvoudiger model (5c). De resulterende curve -die niet de boven beschreven aanpassingsproblemen opleverde- toonde toch een matige aanpassing (de residuele kwadratensom bedroeg 25; vgl. Tabel 10.2.). Voor alle meetpunten tussen 2 en 6 jaar werden te hoge waarden gevonden. De veronderstelling dat de z -infectiedruk variabel is geeft dus duidelijk betere resultaten en lijkt dus noodzakelijk binnen het model.

Tenslotte gingen we na, wat het effect was van de veronderstelling dat een zware besmetting in alle gevallen -zowel bij primaire als bij secundaire besmetting, onafhankelijk van een voorgaande primaire infectie- infectie veroorzaakt met vorming van antistoffen, die levenslang aantoonbaar blijven. Op basis van deze veronderstelling ontstaat een eenvoudiger model (5d); het eerste deel van formule (5) geldt dan namelijk voor het hele leeftijdstraject, waarbij het tweede deel vervalt. Dit model (5d), resulteert -met dezelfde aanpassingsproblemen- in een vrijwel even goede aanpassing als (5), met bijna dezelfde waarden voor de parameters. Dat een zware besmetting uitsluitend een sterke serologische "respons" opwekt als ze voorafgegaan is door een primaire infectie, is dus niet een noodzakelijke voorwaarde voor het model, op basis van onze gegevens. De geringe verschillen in uitkomsten tussen dit en het oorspronkelijke model hangen samen met het -volgens beide modellen (5) en (5d)- zeer geringe deel van de primaire infecties dat door zware besmettingen wordt veroorzaakt. Volgens de voorwaarden in model (5) (zie paragraaf 10.3., voorwaarde b.3.) zou dit kleine aantal personen bovendien al snel na de primaire infectie blijvend seropositief zijn tengevolge van, hetzij een zware, hetzij een lichte besmetting.

In het "exacte" model -dat geheel in overeenstemming is met de veronderstellingen 1 t/m 5 en dat wij alleen theoretisch kunnen analyseren- zouden na een primaire infectie door zware besmetting, slechts tijdelijk antilichamen aantoonbaar zijn. Een zo

geïnfecteerde persoon zou -volgens dit model in vergelijking met model (5)- pas later blijvend seropositief worden, nl. uitsluitend na secundaire infectie ten gevolge van een (in vergelijking met de totale frequentie van lichte en zware besmettingen minder vaak voorkomende) zware besmetting. Volgens dit "exacte" model zouden personen na primaire infectie dus -na negatieve seroconversie- gedurende een gemiddeld langere periode seronegatief blijven dan volgens model (5). Mogelijk zou dit tot een iets betere aanpassing van de curve op jonge leeftijd (tot ongeveer 4 jaar) kunnen leiden. Omdat het verschil tussen model (5) en het "exacte" model -naar verwachting- slechts een klein deel van alle personen betreft, zal de curve volgens het "exacte" model slechts weinig verschillen van de curven die wij met model (5) berekenden.

10.5. DISCUSSIE

Om de resultaten betreffende het voorkomen van IgG-antilichamen in verschillende leeftijdsklassen te kunnen verklaren, stellen wij op basis van literatuurgegevens een hypothese op die berust op de veronderstellingen dat er twee soorten infecties bestaan: primaire infecties met een zwakke serologische respons en secundaire infecties met een krachtige respons ten gevolge van een "booster" effect en twee soorten besmettingen: lichte en zware besmettingen, de laatste met variabele frequentie en in staat om de immuniteit na primaire infectie te doorbreken. Deze hypothese ligt ten grondslag aan het mathematische model (5).

In dit model wordt de infectiedruk (het gemiddelde aantal effectieve besmettingen per individu per jaar) door lichte besmettingen constant gesteld en die door zware besmettingen weergegeven door een symmetrische logistische curve (4). Dit is slechts een benadering van de werkelijke infectiedruk. Ten aanzien van lichte besmettingen bijvoorbeeld, zou men op de kleuterschoolleeftijd -net als bij de zware besmettingen- een toename van de infectiedruk verwachten. Op die leeftijd zal een dergelijke toename echter weinig invloed op de resultaten hebben, omdat volgens onze berekeningen meer dan 95% van de kinderen op die leeftijd

immuun is voor lichte besmettingen. Het effect van de periodiek terugkerende epidemische verheffingen -die, naar men mag aannemen, samenhangen met een (tijdelijk) verhoogde infectiedruk- worden in dit model eveneens buiten beschouwing gelaten.

Met het model (5) kunnen curven worden verkregen, die goed met onze resultaten in ELISA-IgG overeenkomen, beter dan die welke met de modellen van Muench (1959) worden verkregen. Dit geeft steun aan de hypothese die er aan ten grondslag ligt. De goede overeenstemming van de berekende totale infectiedruk (0,7 - 0,9 in de eerste 4 levensjaren, Tabel 10.2.) met die welke aan de hand van de resultaten in ELISA-IgM werd gevonden (Tabel 10.1.), geeft ook steun aan de hypothese.

Wij vonden, dat als men telkens één van de veronderstellingen van de hypothese weglaat of verandert, dit in het algemeen tot minder aanvaardbare oplossingen leidt. Alleen ten aanzien van de veronderstelling (model 5d) dat een zware besmetting in alle gevallen -onafhankelijk van een eventuele voorgaande infectie- infectie veroorzaakt met vorming van antistoffen die levenslang aantoonbaar blijven, konden wij geen uitspraak doen. In feite maakt het voor de resulterende curve en parameters weinig uit of men model (5d) dan wel het ongewijzigde model (5) toepast, omdat -volgens de berekeningen in beide modellen- het aandeel van primaire infecties ten gevolge van zware besmettingen in het totaal aantal van primaire infecties zeer klein is en de verschillen tussen deze modellen alleen op dit deel van de primaire infecties betrekking hebben. In model (5d) worden dus de meeste infecties met vorming van antilichamen die blijvend aantoonbaar zijn, voorafgegaan door een eerdere infectie, in model (5) alle infecties. Beide mogelijkheden zijn in overeenstemming met de hypothese van Fernald *et al.* (1975), dat pneumonieën door *M. pneumoniae* meestal voorafgegaan worden door lichte -naar zij aannemen- "sensibiliserende" infecties. Uit onze berekeningen volgt dat de grootste frequentie van secundaire infecties op de (kleuter)schoolleeftijd optreedt; dezelfde leeftijd waarop ook de grootste frequentie van pneumonieën wordt gevonden (Foy *et al.*, 1970; Foy *et al.*, 1979).

In ons model wordt verondersteld dat er na primaire infecties (partiële) immuniteit ontstaat. Er zijn aanwijzingen dat de immuniteit op oudere leeftijd, dus na secundaire infecties, evenmin

absoluut is, gezien de frequentie van klinische infecties op oudere leeftijd (Foy *et al.*, 1979) en het voorkomen van herinfecties (Foy *et al.*, 1971 i en ii). Omdat herinfecties in een sero-epidemiologisch onderzoek bij seropositieve personen moeilijk aan te tonen zijn, gaan we hier niet nader op in.

De immuniteit na secundaire infecties, al is deze beperkt, zou (mede) verantwoordelijk kunnen zijn voor de periodieke epidemische verheffingen -om de 3 tot 5 jaar (Noah en Urquhart, 1980)- van *M. pneumoniae*-infecties. Men neemt wel aan dat periodiek terugkerende epidemieën van bv. mazelen, rode hond en bof, samenhangen met het ontstaan van een voldoende grote groep vatbare individuen. Deze groep neemt tussen de epidemieën in grootte toe en tijdens de epidemieën weer sterk af. Als dit ook voor *M. pneumoniae*-infecties geldt, zal dit zich vooral bij kleuters manifesteren, omdat kleuters waarschijnlijk de belangrijkste schakel zijn in de verspreiding van *M. pneumoniae*-infecties (Foy *et al.*, 1970). Wij vonden onder de vijfjarigen in 1977 -vóór de epidemie van 1978/1979- een geringer aantal voor IgG-antilichamen seropositieve kinderen dan onder de vijfjarigen in 1979 (Tabel 9.3.); ook de gemiddelde antistoftiter was bij de eerstgenoemde kinderen lager. Tussen de leeftijd van 4 en 5 jaar zagen wij een sterke stijging in frequentie van positieve sera onder de sera uit 1979. Een soortgelijke stijging deed zich voor tussen 5½ en 7 jaar onder de sera uit 1977. Hieruit kan men afleiden dat er in 1977 inderdaad meer vatbare kinderen waren dan in 1979. Men kan berekenen dat de sterke stijging voorkwam bij die kinderen die tijdens de voorafgaande epidemie (1974/1975, respectievelijk 1978/1979; zie noot bij Hoofdstuk 9) ongeveer 4 jaar waren, dus juist de kleuterschool bezochten. Het wisselende patroon naar duur, intensiteit en frequentie van de epidemische verheffingen van *M. pneumoniae* (Foy *et al.*, 1979) kan er op wijzen dat naast immuniteit ook andere, nog onbekende factoren -bv. veranderingen van antigene componenten, waarnaar nog vrijwel geen onderzoek is verricht- invloed hebben op de epidemiologie van *M. pneumoniae*.

Het verschil in relatieve frequentie van positieve sera tussen mannen en vrouwen (Tabel 9.3.) is zo klein, dat er geen bezwaar tegen is de resultaten als één geheel te onderzoeken. Het was opvallend dat de titer van IgM-antistoffen bij de onderzochte

meisjes in de leeftijdsgroepen tussen $\frac{1}{2}$ en 4 jaar (12 van de 12 positief; gem. titer 3,2 E.U.) aanzienlijk hoger was dan die bij de jongens van deze groepen (12 van de 17 positief; gem. titer van de positieve sera 1,6 E.U.). Dit zou er op kunnen wijzen, dat meisjes na een infectie met *M. pneumoniae* meer (gedurende langere tijd) specifieke IgM-antistoffen vormen dan jongens. Op deze leeftijd is er -zoals ook voor andere luchtweginfecties wordt gevonden- een duidelijk verschil tussen jongens en meisjes ten aanzien van het voorkomen van klinisch manifeste infecties: Foy *et al.*

(1979) vonden bij jongens jonger dan 5 jaar een ruim driemaal hogere frequentie van pneumonieën door *M. pneumoniae* dan bij meisjes van dezelfde leeftijd. De aard van ons onderzoek laat geen conclusies toe ten aanzien van een eventuele samenhang tussen deze twee, van het geslacht afhankelijke, verschillen in reactie op infectie met *M. pneumoniae*.

De hogere frequentie van sera met hoge IgG-antistoftiters bij mannen boven 50 jaar (9.2.7.) zou kunnen wijzen op een hogere frequentie van (ernstige) infecties bij hen dan bij vrouwen. Dit is in overeenstemming met de resultaten van Foy *et al.* (1979), die op alle leeftijden, behalve tussen 20 en 40 jaar, bij mannen vaker pneumonieën door *M. pneumoniae* zagen dan bij vrouwen; in verhouding tot de totale incidentie was -met uitzondering van de hierboven genoemde leeftijdsgroep onder 5 jaar- het verschil het grootst boven 50-jarige leeftijd.

Wat betreft het voorkomen van IgM-antilichamen vinden wij dat voor de leeftijdsgroepen tot 30 jaar zowel model (2) als model (3) van toepassing kunnen zijn. Model (2) resulteert in de beste aanpassing. Als we de berekeningen toepassen op de leeftijdsgroepen tot 60 jaar, levert alleen model (3) een goede aanpassing op met parameters die goed overeenkomen met die van hetzelfde model voor de groepen tot 30 jaar. Model (3) gaat uit van volledige immuniteit na een infectie, model (2) van volledige vatbaarheid na het verdwijnen van de antilichamen (zie 10.2.). Zoals we reeds eerder opmerkten, bestaat er na infectie door *M. pneumoniae* waarschijnlijk een partiële (geen volledige) immuniteit, zodat het niet verwonderlijk is dat beide modellen niet geheel passen. Volgens beide modellen is de infectiedruk hoog, respectievelijk 0,9 en 0,75. De berekende infectiedruk is nog hoger, wanneer we aannemen

dat kinderen gedurende de eerste 3 levensmaanden immuun zijn. De aanpassing van de curven is dan echter slechter. Dit is een aanwijzing dat er op zuigelingenleeftijd geen (absolute) bescherming tegen infectie met *M. pneumoniae* bestaat. Dit lijkt in strijd met de bevindingen van Foy *et al.* (1979) die bij kinderen, jonger dan een half jaar, vrijwel geen infecties zagen. Mogelijk berust dit verschil op het feit dat hun onderzoek (vrijwel) uitsluitend betrekking had op infecties met duidelijke klinische verschijnselen (pneumonien).

Uit de berekende waarden voor de "reversion rate" b is af te leiden dat IgM-antilichamen na een infectie langdurig aantoonbaar blijven, gemiddeld 10 jaar volgens model (2) en 110-140 jaar volgens model (3) (Tabel 10.1.a.). De hoge frequentie van personen met IgM-antilichamen -ongeveer 90%(!) voor personen van 5 tot 30 jaar- hangt hiermee samen. Tussen 2 en 8 jaar is de frequentie van personen met IgM-antilichamen zelfs hoger dan van die met IgG-antilichamen. Dit vonden wij al eerder in een groep sera van personen van 2-10 jaar, die beschreven werd in Hoofdstuk 5.3. In het daar beschreven onderzoek werden de uitkomsten van proeven met *M. pneumoniae*-antigeen vergeleken met die met controle-antigeen. De bevindingen wezen er op dat de aangetoonde IgM-antilichamen specifiek zijn. Andere argumenten voor de specificiteit van de aangetoonde IgM-antilichamen werden in Hoofdstuk 9 gegeven.

Ter verklaring van het persisteren van IgM-antilichamen tegen *M. pneumoniae* zou men kunnen overwegen dat *M. pneumoniae* zelf, ergens in het lichaam, persisteert en daardoor een langdurige IgM-"respons" oproept. Persisteren van IgM-antilichamen ziet men soms bij chronische hepatitis B; meestal is dan ook hepatitis B-antigeen aantoonbaar, hetgeen wijst op een persisterende infectie (Niermeyer en Gips, 1978; Gerlich *et al.*, 1980; Krijger *et al.*, 1981; Tedder en Wilson-Croome, 1981). Ook bij syphilis -een aandoening, waarbij zoals bekend, de verwekker langdurig persisteert- zijn gedurende langere tijd IgM-antilichamen aantoonbaar. Deze IgM-antilichamen verdwijnen indien tijdig adequate behandeling wordt toegepast (Shannon en Booth, 1977). Deze twee voorbeelden wijzen er op dat langdurige aanwezigheid van IgM-antilichamen kan samenhangen met persisteren van de ziekteverwekker.

Dat dit ook voor *M. pneumoniae* zou gelden, lijkt op het eer-

ste gezicht onwaarschijnlijk, omdat *M. pneumoniae* slechts bij acute aandoeningen of -bij jonge, gezonde kinderen (Canchola *et al.*, in: Brunner *et al.*, 1977 ii)- voorbijgaand in de luchtwegen kan worden aangetoond. Buiten de luchtwegen is *M. pneumoniae* alleen bij ernstige (letale) infecties en bij patiënten met stoornissen in de immuunafweer (Hoofdstuk 1) gevonden. Het is dus niet duidelijk hoe en waar *M. pneumoniae* zou kunnen persisteren.

Onlangs werd *M. pneumoniae* echter aangetoond in "buffy coat" en liquor van een patiënt met het syndroom van Guillain-Barré (Bayer *et al.*, 1981; zie Hoofdstuk 1, Isolatie). In dit onderzoek lukte het niet *M. pneumoniae* met de conventionele kweektechnieken aan te tonen. Dit zou er op kunnen wijzen, dat *M. pneumoniae* in een vorm kan voorkomen, die niet op de thans in gebruik zijnde voedingsbodems gekweekt kan worden en dat deze vorm zich in het lichaam kan verspreiden of dat *M. pneumoniae* -na invasie in het lichaam- van vorm kan veranderen.

Dat Mycoplasma-soorten kunnen persisteren blijkt uit onderzoek bij dieren. Persisterende infecties met verschillende, voor dieren pathogene Mycoplasma-soorten zijn beschreven (Tully en Whitcomb, 1979). Persisterende infecties in gewrichten -o.a. door *M. arthritidis* en *M. pulmonis* bij muizen, *M. synoviae* bij kuikens en *M. hyorrhinis* en *M. hyosynoviae* bij varkens- zijn het meest uitvoerig onderzocht (Cole en Ward, 1979).

Van *M. hyorrhinis* is een -*in vitro*- obligaat parasitaire vorm beschreven, die zich alleen in levende cellen (celkweek) kan vermenigvuldigen (Hopps *et al.*, 1973). Het lukte slechts onder bepaalde omstandigheden, en dan nog niet altijd, om deze vorm op conventionele wijze (op agar) te kweken. Indien van *M. pneumoniae* ook een dergelijke vorm -*in vivo*- bestaat, zou dit de hierboven genoemde bevindingen van Bayer *et al.* kunnen verklaren.

Het onderzoek van Bayer *et al.* (1981) wijst op een mogelijke relatie tussen de aanwezigheid van (een bepaalde vorm van) *M. pneumoniae* en het syndroom van Guillain-Barré. Het is denkbaar dat een dergelijke relatie ook bestaat voor andere met Mycoplasma samenhangende aandoeningen van het zenuwstelsel, de huid (erythema exudativum multiforme) en de gewrichten, die nu zoals in Hoofdstuk 1 werd beschreven, worden toegeschreven aan auto-immuunprocessen.

De hypothese dat de langdurige aanwezigheid van IgM-antili-

chamen wordt veroorzaakt door persisteren van *M. pneumoniae*, wordt slechts gesteund door indirecte aanwijzingen, maar verdient, gezien de mogelijke implicaties, nader onderzoek.

10.6. CONCLUSIE

De resultaten van het sero-epidemiologisch onderzoek op *M. pneumoniae* kunnen worden verklaard op basis van de veronderstelling dat er twee soorten infecties bestaan: primaire infecties met een zwakke serologische respons en secundaire infecties met een krachtige respons ten gevolge van een "booster" effect en twee soorten besmettingen: lichte en zware besmettingen, de laatste met variabele frequentie. Voor primaire infecties zou de infectiedruk (aantal effectieve besmettelijke contacten per individu per jaar) ongeveer 0,75 - 0,90 zijn. Na een primaire infectie zouden IgG-antilichamen kort (gemiddeld ongeveer 1½ jaar) aantoonbaar blijven, IgM-antilichamen langer. De infectiedruk voor secundaire infecties -die alleen door zware besmetting zouden kunnen ontstaan- zou lager zijn dan die voor primaire infecties; deze infectiedruk zou met de leeftijd toenemen tot een maximum van ongeveer 0,3 op de kleuterschoolleeftijd. Na secundaire infecties zijn IgG-antilichamen levenslang aantoonbaar; IgM-antilichamen zeer lang (mogelijk één tot enkele decennia). De langdurige aanwezigheid van IgM-antilichamen zou kunnen wijzen op persisteren van *M. pneumoniae*.

Vergelijking van de frequentie en de titers van antilichamen in sera van kinderen uit 1977 en uit 1979 geeft aanwijzingen dat het periodiek terugkeren van epidemische verheffingen van *M. pneumoniae*-infecties samenhangt met de immuniteit van kleuterschoolkinderen.

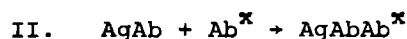
A. REACTIES IN DE INDIRECTE SANDWICH-ELISA VOOR ANTILICHAMEN

In de indirecte sandwich-ELISA voor antilichamen vinden de volgende reacties plaats, nadat het antigeen is geabsorbeerd aan de wand:

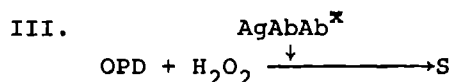


Ag = antigeen

Ab = antilichaam



Ab^x = conjugaat



OPD = substraat

S = geoxydeerd substraat (kleurstof)

IV. De extinctie van de ontstane kleurstof wordt met behulp van een spectrophotometer gemeten en is een maat voor de omgezette hoeveelheid kleurstof.

In deze samenvatting zijn de reacties slechts schematisch weergegeven. In eerste instantie zullen we er van uitgaan, dat ze in één richting (naar rechts) verlopen. Vervolgens zullen we nagaan wat de gevolgen zijn van het feit dat met name reactie I. en II. evenwichtsreacties zijn, voor het verloop van de dosis-respons curve.

B. MODEL VOLGENS EVENREDIGHEDEN

- Als alle, in het serum aanwezige, antilichamen door het antigeen worden gebonden, geldt:

$$\left[\text{AgAb} \right] = \left[\text{Ab} \right] = \frac{C}{d} \quad (1)$$

C = concentratie van antilichamen in
onverdund serum
d = verdunningsfactor

- Als alle gebonden antilichamen een evenredige hoeveelheid conjugaat binden, geldt:

$$\left[\text{AgAbAb}^x \right] = k_1 \left[\text{AgAb} \right] = k_1 \cdot \frac{C}{d} \quad (2)$$

- Als de hoeveelheid omgezet substraat evenredig is met de hoeveelheid gebonden enzym (conjugaat), geldt:

$$S = k_2 \cdot \left[\text{AgAbAb}^x \right] = k_2 \cdot k_1 \cdot \frac{C}{d} \quad (3)$$

- De extinctie is evenredig met de hoeveelheid geoxydeerd substraat:

$$A = k_3 \cdot S = k_1 \cdot k_2 \cdot k_3 \cdot \frac{C}{d} \quad (4)$$

A = extinctie

k_1 , k_2 en k_3 zijn constanten

- Dus de extinctie is binnen een reeks serumverdundingen omgekeerd evenredig met de verdunning:

$$A = K/d \quad (5)$$

$$\text{waarbij: } K = k_1 \cdot k_2 \cdot k_3 \cdot C \quad (5a)$$

- Dubbellogaritmisch weergegeven is dit:

$$L = E - x \quad (6)$$

$$\text{waarbij: } L = {}^{10}\log A$$

$$E = {}^{10}\log K$$

$$x = {}^{10}\log d$$

De voor dit model gebruikte veronderstellingen werden geopperd door Voller *et al.* (1978) bij hun beschrijving van de ELISA. Op

een log-log schaal weergegeven, is deze functie een rechte (Fig. B.1., lijn 1). Men mag verwachten dat binnen één assay de waarden voor k_1 , k_2 en k_3 voor alle sera gelijk zijn. In dat geval is K -volgens (5a)- een goede, relatieve maat voor de concentratie.

C. INVLOED VAN DE EVENWICHTSREACTIES

Het is aannemelijk dat de reacties I. en II., net als alle antigeen-antilichaam-reacties evenwichtsreacties zijn. Voor dergelijke reacties in homogene systemen geldt in het algemeen:

$$\log \frac{[AgAb]}{[Ab] - [AgAb]} = B \log k + B \log ([Ag] - [AgAb]) \quad (7)$$

De formule ligt ten grondslag aan de curve, die in de immunologie bekend staat als Sips' plot. Hierin is B een maat voor de heterogeniteit van de antilichamen; bij homogene antilichamen is $B = 1$, bij heterogeniteit is B lager. k is een maat voor de affiniteit van de antilichamen.

Het is niet zeker dat in het heterogene ELISA-systeem deze formule ook zal opgaan. Het is echter aannemelijk dat de effecten in ieder geval kwalitatief zullen overeenstemmen met de door deze formule voorspelde effecten.

Wij zullen daarom het effect van het feit dat de reacties I. en II. evenwichtsreacties zijn in eerste instantie kwalitatief beschrijven.

1. We beperken ons in eerste instantie tot de reactie I., waarbij we aannemen dat de veronderstelde evenredigheden voor de overige reacties blijven gelden. Het resultaat is dan een curve zoals die door curve a in Fig. B.1. is weergegeven. Bij hogere verdunningen benadert deze lijn 1 in Fig. B.1. volgens het evenredigheidsmodel. Immers bij lage concentraties van de antilichamen (in de hoge verdunningen) zal het evenwicht van de reactie I. ver naar rechts liggen. Bij lagere verdunningen wijkt de curve steeds meer af naar links, om tenslotte asymptotisch een horizontale lijn te benaderen. Het niveau van deze horizontale lijn komt theoretisch

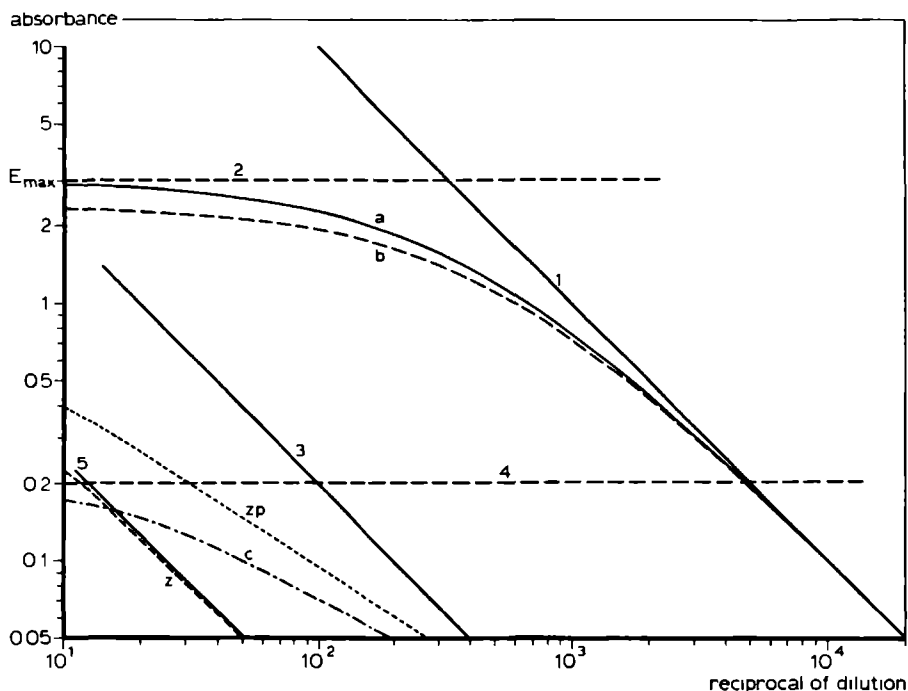


Fig. B.1. Schema van het verloop van de dosis-respons curve in ELISA

Weergegeven worden de curven van een positief serum (1, a en b), van een negatief serum (3 en c) en een zwak positief serum (zp, 5 en z; $zp = z + c$). Voor de betekenis van de noten zij verwezen naar de tekst.

overeen met de extinctie, waarbij alle bindingsplaatsen van het antigeen door antilichamen bezet zouden zijn (E_{\max} , Fig. B.1., lijn 2).

2. Als we vervolgens de effecten van de evenwichtsreactie in reactie II. beschouwen, dan moeten in formule (7) Ag vervangen worden door AgAb, Ab door Ab^x en AgAb door $AgAbAb^x$. Aangezien een constante hoeveelheid conjugaat wordt gebruikt, is Ab^x constant. Hierdoor ontstaat een curve zoals schematisch is weergegeven door b in Fig. B.1. In hoge serumverduunningen ligt ook het evenwicht van reactie II. ver naar rechts, en is de afwijking van lijn 1 gering. Bij lagere verduunningen ligt het evenwicht van de reactie meer naar links. Hierdoor ligt de curve onder de vorige (curve a).

Hoeveel deze curve lager ligt, hangt af van de evenwichts-

constanten overeenkomend met k in formule (7), maar vooral van de relatieve hoeveelheid (overmaat) aan conjugaat (Ab^x).

De tweede reactie kan dus invloed hebben op de maximaal te bereiken extinctie en doet de hele curve enigszins verschuiven. Men mag aannemen dat het effect van reactie II. op elk extinctieniveau gelijk is, omdat de grootte ervan uitsluitend afhankelijk is van de hoeveelheid gebonden antilichamen. Bovendien zal het effect gering zijn, als het conjugaat in voldoende overmaat wordt gebruikt.

In de komende beschouwingen wordt dan ook niet afzonderlijk rekening gehouden met de effecten van deze tweede reactie.

3 en 4. In de overige reacties (III. en IV.) kunnen weliswaar afwijkingen van de evenredigheid ontstaan, maar er zijn geen aanwijzingen dat deze een wezenlijke invloed op het verloop van de curve hebben. Wij laten deze mogelijke verstoringen dan ook buiten beschouwing.

D. ANDERE VERSTORINGEN VAN HET VERLOOP VAN DE CURVE

1. Invloed van de affiniteit

Als de affiniteit laag is, zal k in formule (7) laag zijn. Dit zal resulteren in een "symmetrische" verschuiving van de curve naar "links onder", zoals curve d in Fig. B.2. laat zien.

2. Heterogene antilichamen

Als de antilichamen niet homogeen zijn, wat bij de door ons gehanteerde ELISA in de regel het geval zal zijn, wordt $B < 1$. Men kan zich in dat geval voorstellen, dat de curve is opgebouwd uit een aantal curven, voor elke groep antilichamen afzonderlijk. Dit zal resulteren in een verschuiving "scheef" naar links onder zoals aangeduid door e in Fig. B.2.

3. Complexiteit van het antigeen

Als het antigeen-materiaal verschillende antigene componenten bevat, wat bij het Mycoplasma-antigeen voor ELISA zeker het geval is, zullen de antigeen-antilichaam-reacties niet homogeen zijn. Het effect hiervan op de curve zal in het algemeen overeen

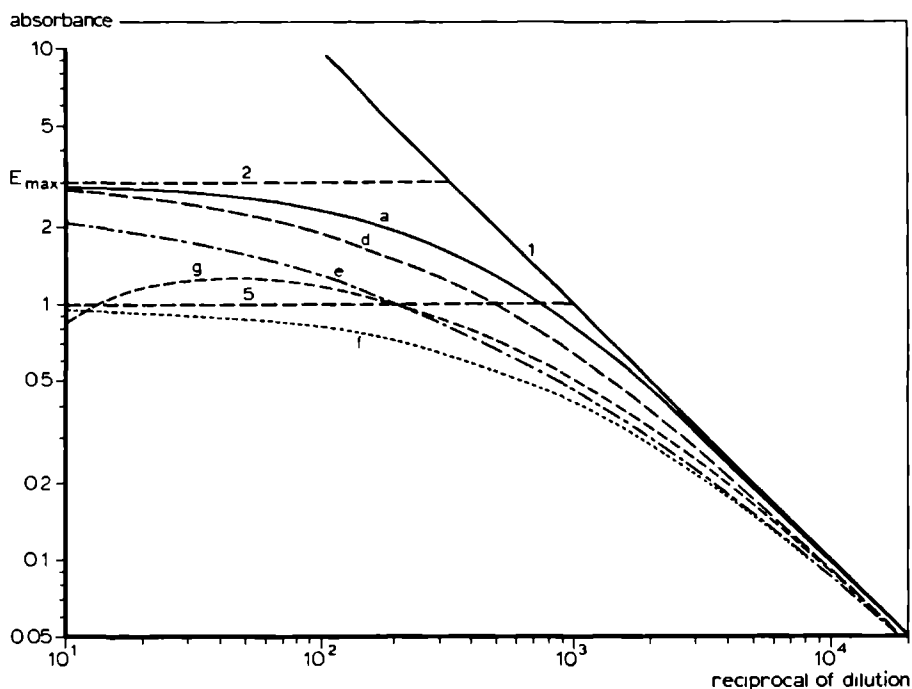
komen met het hierboven beschreven effect van de heterogeniteit van de antilichamen. Als een serum echter tegen sommige van de antigene componenten in het geheel geen antilichamen bevat, zal de curve zich gedragen alsof er minder antigeen is (Fig. B.2., curve f). De E_{\max} zal dan lager liggen (Fig. B.2., lijn 5).

4. Competitie door antilichamen van een andere klasse

In een ELISA voor IgG kan men competitie-effecten verwachten van specifieke IgM-antilichamen en omgekeerd. Ook antilichamen van andere klassen, bv. IgA, kunnen in principe competitie geven. Bij hoge verdunningen van het serum zal er een overmaat van anti-

Fig. B.2. Schema van afwijkende dosis-respons curven in ELISA

De curve van een "normaal" positief serum wordt weergegeven (a) en de curven, ingeval van lagere affiniteit (d), heterogene antilichamen (e), heterogeen antigeen (f) en competitie door antilichamen van een andere klasse (g).



geenbindingsplaatsen zijn, en competitie van antilichamen van verschillende klassen zal er weinig of geen invloed op hebben, hoeveel antilichamen gebonden worden van de klasse die men wil aantonen. De curve zal bij hoge verdunningen dan ook weinig afwijken van de curve zonder competitieve antilichamen. Bij toenemende serumconcentratie, dus bij lagere verdunningen, zullen echter naar verhouding steeds meer bindingsplaatsen door competitieve antilichamen worden bezet.

Voor de antilichamen die men wil onderzoeken is daardoor in toenemende mate steeds minder antigeen beschikbaar. Dit zal resulteren in een curve die naar "onderen" verschoven is, met een schijnbaar lagere E_{\max} .

Bij sterke competitie is het zelfs mogelijk dat in lagere verdunningen een geringere hoeveelheid van de aan te tonen antilichamen aan het antigeen wordt gebonden (Fig. B.2., curve g). De mate van competitie zal afhangen van de relatieve concentratie en van de relatieve affiniteit van de betrokken antilichamen.

5. Aspecifieke reacties, negatieve en zwak positieve sera

Aspecifieke reacties zullen bij alle sera kunnen voorkomen.

De aard van deze reacties is grotendeels onbekend, maar men kan enkele mogelijke oorzaken onderscheiden:

- er kunnen kruisreacties optreden;
- in een serum kunnen specifieke antilichamen tegen verontreinigingen in het antigeen aanwezig zijn.

Deze twee soorten reacties zullen eenzelfde invloed hebben op de dosis-respons curve, als de specifieke antigeen-antilichaam-reacties. Zij worden door ons niet als echte aspecifieke reacties (in engere zin) beschouwd, evenmin als:

- de reactie die IgM-rheumafactor met specifiek IgG kan aangaan, waardoor de ELISA-IgM een fout-positief resultaat kan opleveren. Mogelijke oorzaken van aspecifieke reacties (in engere zin) zijn:
- antilichamen in serum of conjugaat zouden zich niet-specifiek kunnen hechten aan het plastic van de kommetjes of aan niet tot het antigeen behorende bestanddelen van de coating;
- het is denkbaar dat het serum antilichamen bevat, die een "natuurlijke" affiniteit voor het antigeen (of voor verontreinigingen daarin) bezitten, die niet door voorafgaande antigene

stimulatie is ontstaan. Als dergelijke antilichamen al een rol spelen in ELISA, dan mag men verwachten dat hun concentratie klein is, dat zij niet homogeen zijn en dat de affiniteit over het algemeen laag zal zijn;

- tenslotte moet men rekening houden met de mogelijkheid van aspecifieke reacties, zonder plausibele verklaring.

Bij "negatieve" sera, die geen specifieke antilichamen tegen *M. pneumoniae* bevatten, zal de dosis-respons curve uitsluitend door aspecifieke reacties tot stand komen. De curve van negatieve sera blijkt in de meeste gevallen een verloop te hebben, zoals schematisch is weergegeven door curve c in Fig. B.1. De curve c van negatieve sera toont een veel vlakker verloop dan de curve voor specifieke antilichamen (curve a in Fig. B.1.). De curve verloopt bij zeer lage verdunningen zelfs vrijwel horizontaal, zodat een bepaalde, lage, grenswaarde (Fig. B.1., lijn 4) niet, of alleen in zeer lage verdunningen, bereikt wordt.

Als de aspecifieke reactie evenredig met de concentratie van aspecifiek reagerende serumbestanddelen zou zijn, zou lijn 3 in Fig. B.1. ontstaan (analoog aan lijn 1 in Fig. B.1. voor specifieke reacties).

Bij sterk positieve sera zal de invloed van aspecifieke reacties op de dosis-respons curve te verwaarlozen zijn. Bij zwak positieve sera zal de curve worden bepaald door zowel de aspecifieke als de specifieke reacties. Een dergelijke curve wordt schematisch weergegeven door de curve zp in Fig. B.1. Men kan zich voorstellen dat deze is opgebouwd uit een specifiek deel (z) en een aspecifiek deel (c). In hoge verdunningen is het verschil in extinctie van deze curve met die van de negatieve curve (c) gering, bij lage verdunningen is dit verschil door het steilere verloop van de curve voor specifieke antilichamen (met een grote affiniteit) veel groter. Terwijl de curve van het negatieve serum de grenswaarde niet bereikt, wordt door de curve van het zwak positieve serum de grenswaarde al bij een tamelijk hoge verdunning overschreden (zie ook Fig. 4.1., curve 5 en 8).

Om tot een zo goed mogelijke beschrijving van de curve in ELISA te komen, werd een aantal mathematische modellen opgesteld (Drs. J. van Druten, Dr. R. de Graaf, A.J.A. van Griethuysen). In eerste instantie hebben wij getracht een model op te stellen, waarin de evenredigheidsfactor E (formule (6)) geldig bleef, maar waaraan een correctiefactor werd toegevoegd voor de onder C en D genoemde afwijkingen.

•Model 1:

$$L(x) = E - (b - 1) x - fe^{-gx} \quad (8)$$

e = grondtal natuurlijke logarithme

Dit model is afgeleid van (6). Op grond van vroegere onderzoeken mocht men verwachten dat $-(b - 1)$ kleiner dan 1 zou zijn (van Loon en van der Veen, 1980). De exponentiële term werd toegevoegd omdat te verwachten was dat de correctie groter zou moeten zijn bij lage verdunningen.

•Model 2:

Voor model 2 werd uitgegaan van de logit van de gemeten extinctie (A) ten opzichte van de theoretisch bereikbare extinctie K/d (volgens formule (5)):

$$10 \log \frac{A}{K/d - A} = \alpha + \beta 10 \log d \quad (9)$$

Dit is een logit-log-model met drie parameters (K, α en β), dat werd opgesteld naar analogie van modellen die voor radio-immunoassays worden gebruikt (Rodbard *et al.*, 1969). Hoewel de logit in dit model overeenkomt met die in (7), is dit model niet rechtstreeks af te leiden van de formule van Sips' plot. Omdat in ELISA de dosis-respons curve het resultaat is van twee (in plaats van één) antigeen-antilichaam-reacties, ligt het ook niet voor de hand dat de curve volgens (7) zal verlopen. Voor statistische analyse werd dit model in een expliciete vorm gebruikt:

$$L = E - x + {}^{10}\log \left(\frac{10^{\alpha} + \beta x}{1 + 10^{\alpha} + \beta x} \right) \quad (10)$$

$$\text{hierin is: } E = {}^{10}\log k$$

$$x = {}^{10}\log d$$

$$L = {}^{10}\log A$$

Het eerste deel van (10) komt overeen met (6). De laatste term met de parameters α en β geeft een correctie op het lineaire verband tussen L en x . Deze correctie neemt af bij hogere verdunningen want $\beta > 0$ (volgens (9)).

Als $\beta = 1$ gaat de formule over in:

$$L = E - {}^{10}\log (d + \gamma) \quad (11)$$

$$\text{waarin: } \gamma = 10^{-\alpha}$$

•Model 3:

$$L = E + (b - 1) {}^{10}\log (d + c) \quad (12)$$

(deze vorm van model 3 komt overeen met model 3a (2.2.7.)); $b - 1$ is daar vervangen door b).

Dit model ontstond door toevoeging van de lineaire component c (die in het dubbellogaritmische model een toenemende verschuiving ten opzichte van lineair geeft bij lage verdunningen) in het log-log-model zoals dat o.a. door van Loon en van der Veen (1980) werd gehanteerd:

$$L = E + b' {}^{10}\log d \quad (13)$$

$$b' = b - 1$$

Deze vereenvoudigde vorm van model 3, met 2 parameters E en b' , komt overeen met model 3b (2.2.7.).

Formule (11) gaat, als $b = 0$ over in:

$$L = E - {}^{10}\log (d + c) \quad (14)$$

Deze vorm van model 3, met 2 parameters E en c , wordt aangeduid als 3c (2.2.7.). Model 2 (formule (10)) en model 3 (formule (12)) krijgen dezelfde vorm als $b = 0$ respectievelijk $\beta = 1$ (vergelijk (11) met (14)). Aangezien in de praktijk de waarden van $(1 - b)$ en van β meestal niet ver van 1 afwijken, valt het te verwachten dat deze twee modellen ongeveer gelijkwaardig zijn als beschrijving van de curven.

In model 2 (formule (10)) komt de correctie alleen tot uiting in een extra toegevoegde term en betreft niet wijzigingen van de parameter en (of) de coëfficiënt in de eenvoudige formule (6). Bij model 3 is dit laatste wel het geval, zodat het minder waarschijnlijk is dat E in model 3 een goede maat voor de relatieve concentratie kan zijn.

De parameter b zal ongeveer 0 zijn om de volgende reden: in hoge verdunningen is de correctiefactor c klein ten opzichte van de verdunningsfactor d.

De curve:

$$L = E + (b - 1) 10 \log d$$

zal dus in het gebied van de hoge verdunningen nauw moeten aansluiten bij de gevonden meetpunten. Dit deel van de curve, zal volgens paragraaf C niet veel afwijken van (6) zodat b niet veel van 0 zal verschillen. De absolute waarde van de hellingshoek (b - 1) kan niet groter dan 1 worden (wel kleiner, tengevolge van de evenwichtsreacties), dus zal b ≥ 0 zijn. Door fouten in de meting van de extincties, maar ook door een te grote waarde van c, waardoor als het ware "overcorrectie" optreedt, kan toch een negatieve waarde voor b worden gevonden.

Als men aanneemt dat b gelijk is aan 0, dan is eenvoudig in te zien dat c een positieve waarde zal hebben. c geeft namelijk een correctie op de verdunningsfactor voor de verschuiving naar links van de dosis-respons curve ten opzichte van de curve volgens evenredigheden (6), zoals Fig. B.1. laat zien.

F. VERGELIJKING MET ANDERE MODELLEN

1. Lineaire log-log-model

Model 3 is afgeleid van het lineaire log-log-model (13). Voor M. pneumoniae blijkt de toevoeging van de "verschuivingscomponent" c een essentiële verbetering te geven. Toch heeft het lineaire model zijn bruikbaarheid bewezen (van Loon en van der Veen, 1980). Het is eenvoudig in te zien dat het lineaire model weinig zal afwijken van model 3, als c klein is ten opzichte van d. Dit zal het geval zijn als het evenwicht in reactie I. ver naar rechts ligt, dus bij:

- a) hoge serumverduunningen (lage concentraties antilichamen);
- b) relatief grote hoeveelheid antigene bindingsplaatsen bv. bij gebruik van gezuiverd antigeen, dat slechts één of enkele antigene componenten bevat;
- c) grote affiniteit van de antilichamen.

2. Logit-log-model met maximale extinctie (E_{\max} -model)

In paragraaf C.1. zagen we dat door de interacties in reactie I., de extinctie bij lage verduunningen een maximum benadert, dat bepaald wordt door de beschikbare hoeveelheid antigeen. Op grond hiervan werd, naar analogie van rekenmethoden die voor radio-immunoassays worden gehanteerd door van Loon (1980, niet gepubliceerd onderzoek), een gewijzigd logit-log-model opgesteld. Hierbij werd in de logit, in plaats van de met de beschikbare hoeveelheid antilichamen overeenkomende extinctie (model 2), de maximale extinctie d.i. de extinctie die bereikt wordt, wanneer alle antigene bindingsplaatsen door antilichamen zijn bezet, ingevuld (E_{\max}):

$$10 \log \frac{A}{E_{\max} - A} = E' + (b - 1) 10 \log d \quad (15)$$

of:

$$L = 10 \log (c' E_{\max}) - 10 \log (d^1 - b + c') \quad (16)$$

$$\begin{aligned} \text{met: } L &= 10 \log A \\ E' &= 10 \log c' \end{aligned}$$

Ook deze formule gaat, als $b = 0$, over in een met (11) en (14) overeenkomende vergelijking. Als $b = 0$ (respectievelijk $\beta = 1$) is het E_{\max} -model dus gelijk aan model 2 en 3. Het valt dus te verwachten dat dit model in veel gevallen gelijkwaardig is aan de modellen 2 en 3 om de curve te beschrijven.

Een voordeel van dit model is, dat als het mogelijk is een redelijke schatting van E_{\max} te maken, door bv. een sterk positief serum in lage verduunningen te onderzoeken, een model met slechts 2 parameters ontstaat. Zoals besproken in paragraaf D kunnen hierbij theoretisch door bv. complexe antigenen en competitieve antilichamen afwijkingen ontstaan.

BIJLAGE II. THEORETISCHE ACHTERGRONDEN VAN DE BEREKENING VAN TITERS EN ELISA-EENHEDEN (E.U.) IN ELISA

In ELISA wordt dikwijls een methode, gebaseerd op de eindpunttitratie, gebruikt voor het berekenen van titers (Gravell *et al.*, 1977; Gillman en Docherty, 1977; Yolken *et al.*, 1978; van Loon en van der Veen, 1980). De titer wordt dan gedefinieerd als: die verdunning, waarin het serum een bepaalde extinctie (het eindpunt) bereikt. Er zijn geen algemeen aanvaarde methoden om het eindpunt vast te stellen. De wijze waarop dit gebeurt, loopt in verschillende studies uiteen.

De door ons gebruikte methode van bepaling van de titers is vergelijkbaar met een eindpunttitratie. Met behulp van een berekening volgens model 3 wordt de dosis-respons curve berekend. Het snijpunt van deze dosis-respons curve met het niveau van een grenswaarde-extinctie wordt berekend. Dit is de titer. Wij geven de voorkeur aan de naam grenswaarde, omdat bij deze extinctie de reactie in ELISA niet -zoals door de naam eindpunt wordt gesuggereerd- als negatief te beschouwen is.

Een geschikte grenswaarde moet aan de volgende voorwaarden voldoen:

1. voor kwantitatieve bepaling van de hoeveelheid specifieke antilichamen moet de grenswaarde zo laag liggen, dat de dosis-respons curve niet ver afwijkt van de curve volgens evenredigheden (vgl. o.a. curve a en l in Fig. B.1. en B.2.);
2. de grenswaarde moet binnen het optimale meetbereik van de spectrophotometer liggen (dus de extinctie moet groter zijn dan 0,1);
3. de definitie van de grenswaarde moet zodanig zijn, dat de resulterende titer in verschillende assays reproduceerbaar is;
4. ook lage titers van specifieke antistoffen moeten goed te onderscheiden zijn van titers die berusten op aspecifieke reacties. Fig. B.1. (lijn 4) laat zien dat dit het geval zal zijn als de grenswaarde zo gekozen wordt, dat deze juist boven het niveau van de extincties van negatieve sera in lage verdunning ligt. Dan zullen de curven van negatieve sera de grenswaarde niet of slechts in lage verdunningen bereiken (en dus negatieve

of zeer lage waarden opleveren), terwijl positieve sera dit -door de additie van specifieke en aspecifieke reacties- wel zullen doen (en dus positieve resultaten opleveren, Fig. B.1., curve zp). Het effect, dat het verschil in extinctie tussen negatieve en zwak positieve sera in lage verdunningen het grootst is, draagt bij tot een goede discriminatie.

In Hoofdstuk 5.1. wordt beschreven hoe de grenswaarde in ELISA voor *M. pneumoniae* werd bepaald. De keuze van de grenswaarde voor berekening van de titer -en daarmee de hoogte van de titer- is enigszins arbitrair. Om een waarde te verkrijgen, die minder afhankelijk is van de keuze van de grenswaarde, en die bovendien duidelijker kwantitatieve informatie (negatief, zwak en sterk positief) geeft, werden de resultaten in ELISA-units (E.U.) weergegeven. Het aantal E.U. van een serum is -volgens onze definitie- de titer van dit serum gedeeld door de titer (in onze ELISA: 50) van het (negatieve) controleserum. Indien de waarde in E.U. van het controleserum niet op 1 is gesteld, moet het resultaat nog met het aantal E.U. van het controleserum worden vermenigvuldigd. In onze ELISA hebben de negatieve controlesera een waarde van 1 E.U.; doordat deze controlesera "borderline sera" zijn (5.3.), ligt de grens tussen positief en negatief in de buurt van 1 E.U.

De door ons gebruikte methode om de resultaten van ELISA weer te geven ("E.U.-methode") is enigszins vergelijkbaar met de "effective dose" methode van Leinikki *et al.* (1977; 1979). De belangrijkste verschilpunten zijn: er wordt geen evenwijdigheid van de curven verondersteld, de grenswaarde ligt voor alle sera in een assay op hetzelfde, van te voren gedefinieerde niveau en het resultaat wordt lineair, niet logaritmisch weergegeven. De "E.U.-methode" voldoet in het algemeen aan de eisen, die de Savigny en Voller (1980) stellen aan methoden om uitkomsten van ELISA weer te geven:

1. De uitslag is gemakkelijk te begrijpen voor de clinicus die niet vertrouwd is met de details van de techniek voor ELISA.
2. Kwalitatieve informatie (bv. positief, negatief) is gemakkelijk te geven.
3. Bij een positieve uitslag is de uitslag kwantitatief en kan zo

een indicatie geven voor de ernst en het verloop van de infectie.

4. Deze kwantitatieve waarde is recht evenredig met de antilichaamactiviteit, althans bij duidelijk positieve sera (het aantal E.U. van zwak positieve sera wordt mede bepaald door de aspecifieke reacties (Fig. B.1.) en is daardoor niet precies evenredig met de hoeveelheid antilichamen).
5. De uitslag is te vergelijken met waarden in een referentiegroep ("normale" personen of patiënten).
6. De methode om het resultaat te berekenen is reproduceerbaar.
7. De methode zou, volgens bovengenoemde auteurs, vrij moeten zijn van vooronderstellingen. Het is, op methodologische gronden, de vraag of aan deze voorwaarde ooit voldaan kan worden. In ieder geval gaat de E.U.-methode niet uit van de vooronderstellingen, die deze auteurs -als voorbeeld- noemen, nl. dat de curven parallel verlopen en dat de resultaten van negatieve sera normaal verdeeld zijn.
8. De methode is -mede door het gebruik van de computer- geschikt voor retrospectieve en prospectieve analyse.
9. De methode zou -volgens bovenstaande auteurs- moeten berusten op één enkele serumverduunning, om een optimale efficiëntie van de ELISA te bewerkstelligen. Aan deze eis wordt niet voldaan. In een bepaling aan de hand van 4 verdunningen -zoals door ons wordt toegepast- kunnen echter ongeveer evenveel sera in een assay worden onderzocht, als in een assay met een zgn. één-puntstitratie in duplo, doordat voor deze laatste methode een groter aantal referentiesera (bv. 4 à 7) moeten worden onderzocht.

Enkele andere punten, die van belang zijn voor de evaluatie van de E.U.-methode, zijn de volgende:

1. Voor de methode is gebruik van een (mini-)computer noodzakelijk.
2. De methode is weinig kwetsbaar voor veranderingen in de proefomstandigheden (5.2., 9.).
3. Er zijn minder referentiesera nodig dan voor een één-puntstitratie.
4. Discriminatie tussen positieve en negatieve sera is optimaal

door de keuze van de grenswaarde en door het gebruik van "borderline" controlesera (5.1.).

5. De reproduceerbaarheid van de bepaling van het aantal E.U. is goed.

6. Aan de hand van een serum met een vastgestelde waarde in E.U. is standaardisatie tussen laboratoria eenvoudig.

Bij punt 5 kan de opmerking worden gemaakt dat het aantal E.U. wordt bepaald aan de hand van sera, waarvan de titer mede door aspecifieke reacties wordt bepaald. Dit kan de reproduceerbaarheid nadelig beïnvloeden, vooral bij veranderingen in de proefomstandigheden (bv. bij gebruik van een andere batch antigeen, die meer of minder gezuiverd is). Bovendien ligt de grenswaarde in dat deel van de curve van de controlesera, waar de hellingshoek klein is, en daarmee ook de precisie van de bepaling van de titer gering is (Schuurs en van Weemen, 1977, p. 26). De reproduceerbaarheid van het aantal E.U. zal dan ook in theorie verbeterd kunnen worden door het gebruik van een (matig sterk) positief referentieserum. Aan de hand van de titer (bepaald met een grenswaarde zoals hierboven beschreven) en het -tevorens vastgestelde aantal E.U. van dit serum kan men dan het aantal E.U. van de overige sera berekenen. Deze modificatie van de methode werd in ons onderzoek niet toegepast.

De E.U.-methode bleek voor ELISA voor *M. pneumoniae* goed te voldoen. In oriënterende proeven met ELISA-IgG voor cytomegalovirus, herpes simplex virus en toxoplasma, bleek de aanpassing van model 3 aan de dosis-respons curve tenminste even goed te zijn als in ELISA voor *M. pneumoniae*. Bovendien waren de verkregen resultaten ook goed reproduceerbaar (van Loon, mondelinge mededeling, 1981). De E.U.-methode lijkt dus een geschikte methode te zijn voor de kwantitatieve weergave van resultaten in ELISA.

In dit proefschrift worden onderzoeken met enzyme immunoassays (ELISA) voor IgG- en IgM-antistoffen tegen *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*) beschreven. Doel was om na te gaan of de diagnose van infecties met *M. pneumoniae* versneld zou kunnen worden met behulp van de ELISA voor IgM-antistoffen. Bovendien werd een sero-epidemiologisch onderzoek verricht.

Een overzicht van de literatuur over *M. pneumoniae* -met nadruk op immunologische en epidemiologische aspecten- en een korte samenvatting van de literatuur over ELISA (Hoofdstuk 1) wordt gevolgd door een beschrijving van materiaal en methoden (Hoofdstuk 2).

Gekozen werd voor de indirecte "sandwich"-ELISA. Als anti-geen werd gebruik gemaakt van *M. pneumoniae*, op glas gekweekt en vervolgens gewassen, met ultrasoon behandeld en gelyseerd (Hoofdstuk 3).

Met behulp van drie mathematische modellen werd de relatie tussen de hoeveelheid antilichamen in serumverduunningen en het bijbehorende resultaat in ELISA (de extinctie) onderzocht (Hoofdstuk 4, Bijlage I). Eén van deze modellen bleek geschikt om, met behulp van een mini-computer, een titer te berekenen. De titer werd zo gedefinieerd dat een goede reproduceerbaarheid en een goed onderscheid tussen negatieve en positieve sera verwacht mocht worden (5.1., Bijlage II). Om een aantal redenen (Bijlage II) werd het resultaat weergegeven in van de titer afgeleide ELISA-eenheden (E.U., 1 E.U. = titer/50). Onderzoek van vier serumverduunningen bleek voldoende om de titer, en dus het aantal E.U., betrouwbaar te bepalen (5.2.). Vervolgens werd de specificiteit van de reactie onderzocht door middel van vergelijking met resultaten, verkregen met een controle-antigeen (*M. pulmonis*, 5.3., 5.4.). De specificiteit ten opzichte van IgM- en IgG-antilichamen werd nagegaan door onderzoek van serumfracties (5.5., 5.6.). Een oriënterend onderzoek werd gedaan naar de invloed van rheuma-factor op ELISA-IgM (5.7.).

De resultaten van de ELISA werden vergeleken met die van bestaande reacties (Hoofdstuk 6). De resultaten van de complement-

bindingsreactie waren goed gecorreleerd met die van ELISA-IgM, minder goed met die van ELISA-IgG. Het omgekeerde gold voor de metabolic inhibition test. De indirecte haemagglutinatietest was minder gevoelig dan ELISA-IgM, maar er bestond een goede correlatie tussen deze reacties; dit laatste gold niet voor ELISA-IgG.

Bij retrospectief onderzoek van patiënten met pneumonie door *M. pneumoniae* bleek de ELISA een goede diagnostische methode te zijn (Hoofdstuk 7). Meestal kon de diagnose aan de hand van onderzoek van één serum -vaak al het "eerste" serum- met behulp van ELISA-IgM (≥ 16 E.U.) of IHA (titer ≥ 20) worden gesteld. Deze reacties bereikten meestal vanaf 10-14 dagen na de eerste ziektedag een diagnostisch niveau (Hoofdstuk 8).

In het sero-epidemiologische onderzoek werden 1437 sera met ELISA-IgG en 360 sera met ELISA-IgM betrokken (Hoofdstuk 9). De sera waren afkomstig van patiënten van verschillende leeftijdsgroepen van wie in 1977 serum was onderzocht wegens verdenking op toxoplasmose. Sera die geïnactiveerd waren (22,9%) leverden afwijkende resultaten op en werden van het verdere onderzoek uitgesloten. Overigens was de reproduceerbaarheid van de ELISA, gemeten aan de resultaten van een positief controleserum, goed. Een klein deel van de sera werd ook onderzocht met behulp van een glycolipide-vrij antigeen (Orion); de resultaten hiervan waren goed gecorreleerd met die met het eigen antigeen. Het is dus onwaarschijnlijk dat kruisreacties met glycolipiden van plantaardige oorsprong (bv. spinazie) een belangrijke oorzaak van positieve resultaten waren.

Vervolgens werd de verdeling van de sera naar aantal E.U. per leeftijdsgroep onderzocht. Onder meer op grond van deze verdeling werd een grens tussen positief en negatief vastgesteld. Binnen elke leeftijdsgroep waren sera van mannen en vrouwen ongeveer even vaak positief. Meisjes tussen $\frac{1}{2}$ en 4 jaar bleken echter een significant hoger niveau van IgM-antilichamen te hebben dan jongens; boven 40 jaar was het niveau van IgG-antilichamen bij mannen hoger dan bij vrouwen.

Om een indruk te krijgen van de invloed van een epidemie werden sera van één leeftijdsgroep (4-5 jaar) uit 1979 onderzocht, het jaar na de epidemie van 1978/1979. De 5-jarigen uit 1979 bleken significant vaker positief dan die uit 1977, hetgeen de rol

van de (kleuter)school in de epidemiologie van *M. pneumoniae*, zoals bekend uit de literatuur, bevestigde.

Tenslotte werd getracht de verkregen resultaten te analyseren met behulp van katalytische modellen (Muench, 1959; Hoofdstuk 10). Voor IgG-antilichamen kon met de eenvoudige modellen van Muench geen bevredigend resultaat worden verkregen. Om deze reden werd een mathematisch model opgesteld, uitgaande van de -op literatuurgegevens gebaseerde- veronderstellingen dat twee soorten besmettingen -lichte en zware- en twee soorten infecties -primaire en secundaire- onderscheiden kunnen worden. Met dit model werden curven verkregen die goed overeenkwamen met de waargenomen resultaten.

De eenvoudige katalytische modellen voldeden wel redelijk voor IgM-antilichamen. Twee modellen, de één uitgaande van blijvende immuniteit na infectie, de ander uitgaande van geen of tijdelijke immuniteit, bleken in aanmerking te komen. Volgens beide modellen bleven IgM-antilichamen lang (gemiddeld 10, respectievelijk >100 jaar) aantoonbaar. Hiermee in overeenstemming was dat bij gemiddeld 90% van de personen tussen 5 en 30 jaar IgM-antilichamen aantoonbaar waren. Ter verklaring van deze onverwachte bevinding wordt de mogelijkheid besproken, dat *M. pneumoniae* na infecties persisteert.

Zowel volgens de berekeningen voor IgM-antilichamen, als voor IgG-antilichamen (wat betreft primaire infecties) is de infectiedruk van *M. pneumoniae* hoog: 0,7 tot 0,9 (effectieve besmettelijke contacten per persoon per jaar). De infectiedruk tengevolge van uitsluitend zware besmettingen is volgens de berekeningen lager; deze neemt gedurende de eerste levensjaren toe, tot op de kleuterleeftijd een niveau van ongeveer 0,3 wordt bereikt.

The aim of this study was to develop enzyme immuno-assays (ELISA) for IgG- and IgM-antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*), to investigate the possibilities of rapid diagnosis (by ELISA-IgM), and to perform a sero-epidemiological study using the methods developed.

A review of the literature on *M. pneumoniae* -with special attention to immunology and epidemiology- and on ELISA (Chapter 1), is followed by a description of materials and methods (Chapter 2). After this the development of ELISA for *M. pneumoniae* is described (Chapter 3). The indirect "sandwich"-ELISA method was chosen. *M. pneumoniae*, grown on a glass surface proved to be a suitable antigen, especially if washed, sonicated and lysed. Nonspecific reactions in ELISA were reduced by adding components of culture medium to the diluents of sera and conjugates.

There is no single generally accepted way of presenting the results of ELISA. For this reason, three mathematical models were investigated to describe dose-response curves in ELISA (Chapter 4). The second model, a logit-log model, was preferable on theoretical grounds; however, for practical reasons -ease of adaptation to a mini-computer- the third model was chosen to calculate titers. This model was a double logarithmic model with a linear component; it was used to calculate dose-response curves. The intersection of these curves with a "cut-off value" was used to define a titer. The absorbance of the negative -in fact "borderline"- reference sera at a dilution of 1:50 was chosen as "cut-off value" (Chapter 5.1.). A value of 1 E.U. (ELISA unit) was assigned to the negative reference sera; the number of E.U. of test sera equalled the titer/50.

Four fourfold dilutions were sufficient to obtain accurate estimates of titers and E.U. (Chapter 5.2., Fig. 5.1.). Specificity of the method was confirmed by comparing results, using *M. pneumoniae*-antigen and control-antigen (*M. pulmonis*, 5.3., 5.4.). These results indicated a borderline between positive and negative sera at 0.7 - 1.0 E.U. and 1 - 2 E.U. for ELISA-IgM and ELISA-IgG respectively (5.3.). Examination of sucrose-gradient

fractions confirmed specificity of ELISA for IgM- and IgG-antibodies (5.5., Fig. 5.2.). The same fractions were used to study the effects in ELISA of competing antibodies of a different class (5.6., Fig. 5.3.). Moderate elevations of titers were found in 18 sera positive for rheuma-factor (5.7.).

Two groups of paired sera (one with CF-titer <4 in both sera; and one with a significant rise in CF-titer) were used to compare ELISA with the complement fixation test (CF), the metabolic inhibition test (MIH), and the indirect haemagglutination test (IHA) (Chapter 6). CF showed good correlation with ELISA-IgM, less with ELISA-IgG (Fig. 6.3.). The opposite applied to MIH (Fig. 6.4.) IHA showed poor correlation with ELISA-IgG, but -though less sensitive- a good correlation with ELISA-IgM (Fig. 6.5.).

ELISA-IgM and ELISA-IgG were potentially useful in the diagnosis of pneumonia caused by *M. pneumoniae* as compared with the CF, MIH, and IHA tests, and with isolation of Mycoplasma (Chapter 7). Because of the high frequency of IgM-antibodies in normal population (5% having >8 E.U., and 1% >16 E.U., Chapter 9) the diagnostic significance of single serum tests by ELISA-IgM was restricted to sera with >8 - 16 E.U. IgM. More than 90% of sera from patients with pneumonia caused by *M. pneumoniae* showed diagnostic IgM-levels; usually from 10 - 14 days to 8 weeks or more after onset of symptoms. Of the "first sera", 59% showed diagnostic values (Chapter 8). Comparable results were obtained with IHA (titer ≥ 20). Both ELISA-IgM and IHA appeared to be useful in the rapid diagnosis of *M. pneumoniae*-pneumonia.

The sero-epidemiological study comprised 1437 sera in ELISA-IgG and 360 sera in ELISA-IgM (Chapter 9). Sera were selected -within each of 13 age groups- from sera, coming from patients with suspected toxoplasmosis in 1977. Sera, inactivated prior to freezing (22,9%), showed deviant results and were excluded. Apart from this, the reproducibility of test results was good, as indicated by the results of positive control-sera (Table 9.2.).

To exclude possible cross-reactions with vegetable glycolipids, the results of 70 sera in ELISA-IgG and of 56 sera in ELISA-IgM were compared with results obtained in ELISA with glycolipid-free antigen (Orion). The results showed good correla-

tion (Fig. 9.1.). Vegetable glycolipids are apparently not an important cause of positive serological reactions in ELISA for *M. pneumoniae*.

An approximately bimodal distribution of titers was seen in most age groups (Fig. 9.2., 9.3.); at ages over 15, low (negative) values were absent in ELISA-IgG. Based on this distribution and some other considerations, sera with levels over 0.84 E.U. IgM and 1.41 E.U. IgG were considered positive. Fractions of positive sera together with mean titers (± 1 s.e.m.) of positive sera are shown in Fig. 9.4. and 9.5.

Comparing sera from males and females, fractions of positive sera of each age group were not significantly different; however, girls between age $\frac{1}{2}$ and 4 years showed significantly higher IgM-levels, while men over 40 years of age had higher IgG-levels (Table 9.3.).

Results of age group 4-5 years -from 1977- were compared with results of the same age group in 1979, the year after the epidemic of *M. pneumoniae* infection in 1978-1979. In 1979 mean titers of positive sera were significantly higher; the fraction of positive sera was greater in 5-year old children only (Table 9.4.), confirming the role of school children (from 4 years of age in Holland) in the epidemiology of *M. pneumoniae* infections.

Epidemiology of *M. pneumoniae* was further analysed by applying Muench's catalytic curves (Chapter 10). These curves were fitted (by weighted non-linear regression) to the datapoints (age-dependent fractions of positive sera). For IgM-antibodies the fit of the "two-stage catalytic curve" (formula 3) was fairly good (Fig. 9.4.), however up to the age of 30 the "reversible catalytic curve" (formula 2) showed a better fit (Table 10.1., Fig. 10.1.). The calculated infection rate was 0.75 - 0.90 (effective contacts per individual per year). The reversion rate indicated long lasting presence of IgM-antibodies after infection (10 or 110-140 years, depending on the curve). In connection with this, 90%(!) of the population between age 5 and 30 was found to be seropositive for IgM-antibodies. It was suggested that this unexpectedly high frequency of IgM-antibodies may be caused by the persistence of *M. pneumoniae*.

Datapoints of IgG-antibodies showed a poor fit with Muench's

curves as illustrated by the results of the "reversible catalytic curve" (Table 10.2., Fig. 9.5.). Therefore, a new mathematical model was developed. This model was based on the following assumptions:

there are two kinds of contaminations, light (l) -with a constant infection rate a - and heavy (z) -with a variable rate, increasing with age and represented by a symmetric logistic function $\lambda(t)$ (formula 4). There are also two kinds of infection, primary and secondary. Primary infections are caused by both light and heavy contaminations, and are followed by the presence of IgG-antibodies, disappearing with a "reversion rate" b . After a primary infection partial immunity -to light contaminations only- exists; however, a heavy contamination will cause a secondary infection, resulting in permanent IgG-antibodies (because of a booster-effect). From these assumptions (with minor simplifying conditions added) the complex model (formula 5) was deducted.

Fitting of this model to datapoints of IgG-antibodies, resulted in curves (Table 10.2., Fig. 10.2.) indicating a primary infection rate of 0.7 - 0.9 and a maximal (asymptotic) secondary infection rate of about 0.3. Modifications of the model were investigated; they did not result in a better fit, or in plausible data for parameters, with one exception: it could not be excluded that heavy contaminations causing primary infections might generate permanent IgG-antibodies. However, curves and parameters calculated with this modified model were hardly different from those of the original model. The hypothesis of two kinds of contamination and two kinds of infection is supported by the good accordance between infection rates based on IgM-data (0.75 - 0.9) and of primary infection rates based on IgG-data (0.7 - 0.9).

The two appendices deal with theoretical backgrounds of ELISA (dose-response curves, mathematical models) and of ELISA-titration (including rendering results as E.U.) respectively.

- Archer, D.B. (1979). *Nature* 277, 268.
- Assaad, F., R. Gispén, M. Kleemola, L. Syřđcek, and K. Esteves (1980). *Bull. WHO* 58, 297.
- Baernstein, H.D., jr., E. Trevisani, S. Axtell, and J.J. Quilligan, jr. (1965). *J. Pediatr.* 66, 829.
- Balassanian, N. and F.C. Robbins (1967). *New Eng. J. Med.* 277, 719.
- Barile, M.F. (1979). *In: The Mycoplasmas II*, Ed.: J.G. Tully and Whitcomb, Academic Press New York, 437.
- Bayer, A.S., J.E. Galpin, A.N. Theofilopoulos, and L.B. Guze (1981). *Ann. Intern. Med.* 94, 15.
- Biberfeld, G. (1968). *J. Immunol.* 100, 338.
- Biberfeld, G. (1971 i). *Acta path. microbiol. scand. Sect. B*, 79, 620.
- Biberfeld, G. (1971 ii). *Clin. exp. Immunol.* 8, 319.
- Biberfeld, G., P. Biberfeld, and H. Wigzell (1976). *Scand. J. Immunol.* 5, 87.
- Biberfeld, G. and E. Gronowicz (1976). *Nature* 261, 238.
- Biberfeld, G. and R. Norberg (1974). *J. Immunol.* 112, 413.
- Biberfeld, G. and G. Sterner (1971). *Acta path. microbiol. scand. Sect. B*, 79, 599.
- Biberfeld, G. and G. Sterner (1976 i). *Clin. exp. Immunol.* 24, 287.
- Biberfeld, G. and G. Sterner (1976 ii). *Scand. J. Inf. Dis.* 8, 71.
- Bigot, P. le, F. Vachon, C. Manuel, et M. Masson (1976). *Rev. Neurol. (Paris)* 132, 791.
- Bredt, W., W. Lam, and J. Berger (1975). *J. clin. Microbiol.* 2, 541.
- Bruggmann, S.T., H. Keller, H.U. Bertschinger, and B. Engberg (1976). *Vet. Rec.* 99, 102.
- Bruggmann, S.T., H. Keller, H.U. Bertschinger, and B. Engberg (1977). *Vet. Rec.* 101, 109.
- Brunner, H. and R.M. Chanock (1973). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 143, 97.
- Brunner, H., H. Greenberg, W.D. James, R.L. Horswood, and R.M.

- Chanock (1973 iii). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 225, 436.
- Brunner, H., H.B. Greenberg, W.D. James, R.L. Horswood, R.B. Couch, and R.M. Chanock (1973 ii). *Infection and Immunity* 8, 612.
- Brunner, H., R.L. Horswood, and R.M. Chanock (1973 i). *J. Infect. Dis.* 127, S52.
- Brunner, H., W.D. James, R.L. Horswood, and R.M. Chanock (1972). *J. Immunol.* 108, 1491.
- Brunner, H., B. Prescott, H. Greenberg, W.D. James, R.L. Horswood, and R.M. Chanock (1977 ii). *J. Infect. Dis.* 135, 524.
- Brunner, H., S. Razin, A.R. Kalica, and R.M. Chanock (1971). *J. Immunol.* 106, 907.
- Brunner, H., W. Schaeg, U. Brück, U. Schlummer, and H.-G. Schiefer (1977 i). *Med. Microbiol. Immunol.* 163, 25.
- Brunner, H., W. Schaeg, U. Brück, U. Schummer, D. Sziegoleit, and H.-G. Schiefer (1978). *Med. Microbiol. Immunol.* 165, 29.
- Busolo, F., E. Tonin, and L. Conventi (1980). *J. clin. Microbiol.* 12, 69.
- Cassell, G.H. and B.C. Cole (1981). *New Eng. J. Med.* 304, 80.
- Cassell, G.H. and A. Hill (1979). *In: The Mycoplasmas II*, Ed.: J.G. Tully and R.F. Whitcomb, Academic Press New York, 235.
- Chanock, R.M., L. Hayflick, and M.F. Barile (1962). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 48, 41.
- Chanock, R.M., M.A. Mufson, H.H. Bloom, W.D. James, H.H. Fox, and J.R. Kingston (1961). *JAMA* 175, 213.
- Cherry, J.D., E.S. Hurwitz, and R.C. Welliver (1975). *J. Pediatr.* 87, 369.
- Clyde, W.A., jr. (1961). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 107, 715.
- Clyde, W.A., jr. (1979). *In: The Mycoplasmas II*, Ed.: J.G. Tully and R.F. Whitcomb, Academic Press New York, 275.
- Clyde, W.A., jr. (1971). *Infection and Immunity* 4, 757.
- Cohen, G. and N.L. Somerson (1967). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 143, 85.
- Cole, B.C. and J.R. Ward (1979). *In: The Mycoplasmas II*, Ed.: J.G. Tully and R.F. Whitcomb, Academic Press New York, 367.
- Collier, A.M. and W.A. Clyde, jr. (1971). *Infection and Immunity* 3, 694.
- Collier, A.M. and W.A. Clyde, jr. (1974). *Am. Rev. Resp. Dis.* 110, 765.

- Costea, N., V.J. Yakulis, and P. Heller (1971). J. Immunol. 106, 598.
- Costea, N., V.J. Yakulis, and P. Heller (1972). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 139, 476.
- Couch, R.B. (1980). In: Principles and Practice of Infectious Diseases, vol. II, Ed.: G.L. Mandell, R.G. Douglas, jr., and J.E. Bennett, John Wiley and Sons, New York, 1484.
- Couch, R.B., T.R. Cate, and R.M. Chanock (1964). JAMA 187, 442.
- Denny, F.W., W.A. Clyde, jr., and W.P. Glezen (1971). J. Infect. Dis. 123, 74.
- Dowdle, W.R. and R.Q. Robinson (1964). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 116, 947.
- Eaton, M.D., G. Meiklejohn, and W. v. Herick (1944). J. Exp. Med. 79, 649.
- Eng, J. (1971). Acta path. microbiol. scand. Sect. B, 79, 107.
- Engvall, E. and P. Perlmann (1971). Immunochemistry 8, 871.
- Erb, P. and W. Bredt (1979). Infection and Immunity 25, 11.
- Feizi, T. and E. Monger (1967). Nature 216, 1025.
- Feizi, T., D. Taylor-Robinson, M.D. Shields, and R.A. Carter (1969). Nature 222, 1253.
- Feizi, T., E.A. Kabat, G. Vicari, B. Anderson, and W.L. Marsh (1971). J. Exp. Med. 133, 39.
- Feldner, J., W. Bredt, and I. Kahane (1979). Infection and Immunity 25, 60.
- Fernald, G.W. (1979). In: The Mycoplasmas II, Ed.: J.G. Tully and R.F. Whitcomb, Academic Press New York, 399.
- Fernald, G.W. (1972). Infection and Immunity 5, 552.
- Fernald, G.W. and W.A. Clyde, jr. (1970). Infection and Immunity 1, 559.
- Fernald, G.W., A.M. Collier, and W.A. Clyde, jr. (1975). Pediatrics 55, 327.
- Fox, G.E., E. Stackebrandt, R.B. Hespell, J. Gibson, J. Maniloff, T.A. Dyer, R.S. Wolfe, W.E. Balch *et al.* (1980). Science 209, 457.
- Foy, H.M. and E.R. Alexander (1969). Adv. Pediatr. 16, 301.
- Foy, H.M., J.T. Grayston, G.E. Kenny, E.R. Alexander, and R. McMahan (1966 ii). JAMA 197, 859.
- Foy, H.M., G.E. Kenny, and J. Koler (1966 i). Lancet September 3,

- Foy, H.M., G.E. Kenny, R. McMahan, G. Kaiser, and J.T. Grayston (1971 i). Am. J. Epidem. 93, 55.
- Foy, H.M., G.E. Kenny, R. McMahan, A.M. Mansy, and J.T. Grayston (1970). JAMA 214, 1666.
- Foy, H.M., G.E. Kenny, M.K. Cooney, and I.D. Allan (1979). J. Infect. Dis. 139, 681.
- Foy, H.M., G.E. Kenny, R. Sefi, H.D. Ochs, and I.D. Allan (1977). J. Infect. Dis. 135, 673.
- Foy, H.M., C.G. Nugent, G.E. Kenny, R. McMahan, and J.T. Grayston (1971 ii). JAMA 216, 671.
- Foy, H.M., H. Ochs, S.D. Davis, G.E. Kenny, and R.R. Luce (1973 ii). J. Infect. Dis. 127, 388.
- Freeman, R., B. King, and M.H. Hambling (1973). J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 66, 642.
- Freundt, E.A. and D.G. ff. Edward (1979). In: The Mycoplasmas I, Ed.: M.F. Barile and S. Razin, Academic Press New York, 1.
- Gabridge, M.G., S.E. Singer, and R.A. Esposito (1976). Appl. Envir. Microbiol. 31, 986.
- Gerlich, W.H., W. Lüer, R. Thomssen *et al.* (1980). J. Infect. Dis. 142, 95.
- Gerritsen, J. en K. Knol (1980). T. Kindergeneesk. 48, 48.
- Gilman, S.C. and J.J. Docherty (1977). J. Infect. Dis. 136, S286.
- Goodburn, G.M. and B.P. Marmion (1962). J. gen. Microbiol. 29, 271.
- Goldstone, A.H. (1979). In: Medical Immunology, Ed.: J. Irvine, Teviot Sci. Publication, Edinburgh, 233.
- Grady, G.F. and R.F. Gilfillan (1979). Ann. Intern. Med. 90, 607.
- Granato, P.A., L. Poe, and L.B. Weiner (1980). Am. J. clin. Path. 73, 702.
- Gravell, M., P.H. Dorsett, O. Gutenson, and A.C. Ley (1977). J. Infect. Dis. 136, S300.
- Greenberg, H., C.M. Helms, H. Brunner *et al.* (1974). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 4015.
- Griethuysen, A.J.A. van, C.L.M. van der Zee en F. Hoevenaars (1981). Ned. T. Geneesk. (geaccepteerd voor publicatie).
- Herderschee, D., A.C. Ruys, and G.R. van Rhijn (1963). Antonie van Leeuwenhoek 29, 157.

- Hernandez, L.A., G.E.D. Urquhart, and W.C. Dick (1977). Brit. med. J. 2, 14.
- Hers, J.F.P.H. and N. Masurel (1967). Ann. N.Y. Acad. Sci. 143, 447.
- Hers, J.F.P.H., N. Masurel, and J.C. Gans (1969). Am. Rev. Resp. Dis. 100, 499.
- Hopps, H.E., B.C. Meyer, and M.F. Barile (1973). Ann. N.Y. Acad. Sci. 225, 265.
- Horowitz, S.A. and G.H. Cassell (1978). Infection and Immunity 22, 161.
- Huysmans-Evers, A.G.M. en A.C. Ruys (1956). Antonie van Leeuwenhoek 22, 377.
- Jensen, K.E. (1964). Bact. Proc. p. 70.
- Jensen, K.J., L.B. Senterfit, W.E. Scully, T.J. Conway, R.F. West, and W.W. Drummy (1967). Am. J. Epidem. 86, 419.
- Jones, M.C. (1970). Thorax 25, 748.
- Kenny, G.E. and R.M. Newton (1973). Ann. N.Y. Acad. Sci. 225, 54.
- Koletsky, R.J. and A.J. Weinstein (1980). Am. Rev. Resp. Dis. 122, 491.
- Kopelman, P. (1977). Brit. med. J. I, 881.
- Krijger, P., L.R. Mathiesen, A.M. Möller, J. Aldershvile, B.G. Hansson, and J.O. Nielsen (1981). J. clin. Microbiol. 13, 405.
- Lachmann, P.J. (1978). In: The Immune System, Ed.: M.J. Hobart and I. McConnell, Blackwell Sci. Publ. Oxford, 152.
- Lambert, H.P. (1968). Brit. med. J. 3, 156.
- Leinikki, P.O., P. Panzar, and H. Tykkä (1973). Scand. J. Gastroenterol. 8, 631.
- Leinikki, P.O., P. Panzar, and H. TYkkä (1978). J. clin. Microbiol. 8, 113.
- Leinikki, P.O. and Pässilä (1977). J. Infect. Dis. 136, S294.
- Leinikki, P.O., I. Shekarchi, P. Dorsett, and J.L. Sever (1978). J. clin. Microbiol. 8, 419.
- Leinikki, P.O., I. Shekarchi, N. Tzan, D.L. Madden, and J.L. Sever (1979). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 160, 363.
- Lind, K. (1971). Acta path. microbiol. scand. Sect. B, 79, 239.
- Lind, K. and M.W. Bentzon (1976). Intern. J. Epidem. 5, 267.
- Liu, C. (1957). J. Exp. Med. 106, 455.

- van Loon, A.M., F.W.A. Heessen, J.Th.M. van der Logt, and J. van der Veen (1981). J. clin. Microbiol. 13, 416.
- van Loon, A.M. en J. van der Veen (1979). Ned. T. Geneesk. 123, 1607.
- van Loon, A.M. and J. van der Veen (1980). J. clin. Path. 33, 635.
- Löwenberg, A. (1980). Ned. T. Geneesk. 124, 673.
- Mårdh, P.-A. and B. Ursing (1974). Scand. J. Infect. Dis. 6, 167.
- Miranda, Q.R., G.D. Bailey, A.S. Fraser, and H.J. Tenoso (1977). J. Infect. Dis. 136, S304.
- Mogabgab, W.J. (1968). Am. Rev. Resp. Dis. 97, 359.
- Mok, J.Y.Q., J.M. Inglis, and H. Simpson (1979). Acta Paediatr. Scand. 68, 833.
- Mollison, P.L. (1979). Blood transfusion in clinical medicine, 6th ed., Blackwell Sci. Publ. Oxford.
- Muench, H. (1959). Catalytic Models in Epidemiology, Ed.: Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Murray, H.W., H. Masur, L.B. Senterfit, and R.B. Roberts (1975). Am. J. Med. 58, 229.
- Naftalin, J.M., G. Wellisch, Z. Kahana *et al.* (1974). JAMA 228, 565.
- Neimark, H. (1979). In: The Mycoplasmas I, Ed.: M.F. Barile and S. Razin, Academic Press New York, 43.
- Niermeyer, P. and C.H. Gips (1978). New Eng. J. Med. 26, 958.
- Niitu, Y., S. Hasegawa, T. Suetake, H. Kubota, S. Komatsu, and M. Horikawa (1970). J. Pediatrics 76, 438.
- Noah, N.D. and A.M. Urquhart (1980). J. Infect. 2, 191.
- Noriega, E.R., M.S. Simberkoff, F.J. Gilroy, and J.J. Rahal (1974). JAMA 229, 1471.
- Oderda, G. and J.R. Kraut (1980). Pediatrics 66, 305.
- Peterson, O.L., T.H. Han, and M. Finland (1943). Science 97, 167.
- Plackett, P., B.P. Marmion, E.J. Shaw, and R.M. Lemcke (1969). Austr. J. exp. Biol. med. Sci. 47, 171.
- Pollack, J.D., N.L. Somerson, and L.B. Senterfit (1973). J. Infect. Dis. 127, S32.
- Pönkä, A. (1978). Scand. J. Infect. Dis. 10, 271.
- Pönkä, A. (1979). Acta Med. Scand. 206, 77.
- Powell, D.A. and W.A. Clyde, jr. (1975). Infection and Immunity 11, 540.

- Price, P.C. (1980). J. Immunol. Meth. 32, 261.
- Purcell, R.H. and R.M. Chanock (1967). Med. Clin. N. Am. 51, 791.
- Räisänen, S.M., J.I. Suni, and P.O. Leinikki (1980). J. clin. Path. 33, 836.
- Razin, S., B. Prescott, G. Caldes, W.D. James, and R.M. Chanock (1970 i). Infection and Immunity 1, 408.
- Razin, S., B. Prescott, W.D. James, G. Caldes, J. Valdesuso, and R.M. Chanock (1971). Infection and Immunity 3, 420.
- Razin, S., B. Prescott, and R.M. Chanock (1970 ii). Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 590.
- Reimann, H.A. (1938). JAMA 111, 2377.
- Rodbard, D., W. Bridson, and P.L. Rayford (1969). J. Lab. Clin. Med. 74, 770.
- Rose, G. and D.J.P. Barker (1978). Brit. med. J. 2, 1070.
- Ruitenberg, E.J. and F. van Knapen (1977). J. Infect. Dis. 136, S267.
- Salonen, E.M. and A. Vaheri (1979). J. Immunol. Meth. 30, 209.
- de Savigny, D. and A. Voller (1980). J. Immunoassay 1, 105.
- Schmidt, P.J., M.F. Barile, and M.H. McGinniss (1965). Nature 205, 371.
- Schuurs, A.H.W.M. and B.K. van Weemen (1977). Clin. Chim. Acta 81, 1.
- Sethi, K.K. and H. Brandis (1972). Med. Microbiol. Immunol. 157, 113.
- Shames, J.M., R.B. George, W.B. Holliday, J.R. Rasch, and W.J. Mogabgab (1970). Arch. Intern. Med. 125, 680.
- Shannon, R. and S.D. Booth (1977). Brit. J. Ven. Dis. 53, 281.
- Shulman, S.T., J. Bartlett, W.A. Clyde, and E.M. Ayoub (1972). New Eng. J. Med. 287, 164.
- Skaug, K., J. Eng, I. Ørstavik, and K.W. Haug (1976). Acta path. microbiol. scand. Sect. B, 84, 170.
- Smith, C.B., W.T. Friedewald, and R.M. Chanock (1967). J. Am. Med. Ass. 199, 353.
- Smith, T.F. (1980). Clin. Microbiol. Newsletter, September 15, 4.
- Smith, T.F. and E.C. Herrmann, jr. (1971). Appl. Microbiol. 21, 160.
- Smith, C. and G. Sangster (1972). Scand. J. Infect. Dis. 4, 69.
- Somerson, N.L., W.D. James, B.E. Walls, and R.M. Chanock (1967).

- Ann. N.Y. Acad. Sci. 143, 384.
- Steinberg, P., R.J. White, S.L. Fuld, R.R. Gutekunst, R.M. Chanock, and L.B. Senterfit (1969). Am. J. Epidemiem. 89, 62.
- Taylor, P. (1979). J. clin. Path. 32, 280.
- Taylor, P. (1980). Mast. Matters 19, 6.
- Taylor, A.G., T.G. Harrison, B.E. Andrews, and M. Sillis (1980). Lancet, April 5, 764.
- Taylor, G., D. Taylor-Robinson, and G.W. Fernald (1974). J. med. Microbiol. 7, 343.
- Taylor-Robinson, D., R.H. Purcell, D.C. Wong, and R.M. Chanock (1966). J. Hyg. Camb. 64, 91.
- Taylor-Robinson, D., A. Shirai, O. Soběslavský and R.M. Chanock (1965). Am. J. Epidemiem. 84, 301.
- Taylor-Robinson, D., A.D.B. Webster, P.M. Furr, and G.L. Asherson (1980). J. Infect. 2, 171.
- Tedder, R.S. and R. Wilson-Croome (1981). J. Hyg. Camb. 86, 163.
- Tully, J.G., D.L. Rose, R.F. Whitcomb, and R.P. Wenzel (1979). J. Infect. Dis. 139, 478.
- Tully, J.G. and R.F. Whitcomb (editors) (1979). The Mycoplasmas II, Academic Press New York.
- Vaughan, J.H. (1979). J. Rheumatol. 6, 381.
- van der Veen, J. and M.C.J. van Nunen (1963). Am. J. Hyg. 78, 293.
- Voller, A., A. Bartlett, and D.E. Bidwell (1978). J. clin. Path. 31, 507.
- van Weemen, B.K. and A.H.W.M. Schuurs (1971). FEBS Letters 15, 232.
- Wenzel, R.P., R.B. Craven, J.A. Davies, J.O. Hendley, B.H. Hamory, and J.M. Gwaltney, jr. (1977). J. Infect. Dis. 136, S204.
- Williams, R.C. and R.J. Gibbons (1972). Science 177, 697.
- Wolters, G., L.P.C. Kuypers, J. Kačák, and A.H.W.M. Schuurs (1977). J. Infect. Dis. 136, S311.
- Wright, D.N., G.D. Bailey, and M.T. Hatch (1968). J. Bact. 96, 970.
- Volken, R.H., R.G. Wyatt, H.W. Kim, A.Z. Kapikian, and R.M. Chanock (1978). Infection and Immunity 19, 540.

De schrijver van dit proefschrift werd op 8 juni 1941 geboren te Gendringen. Hij behaalde in 1959 het diploma gymnasium- β aan het Stedelijk Gymnasium te Nijmegen. Daarna studeerde hij geneeskunde aan de Rijks Universiteit Utrecht, waar hij in 1965 het doctoraal-examen en in oktober 1967 het artsexamen behaalde. Vervolgens was hij -als voorbereiding op een uitzending naar de tropen- tot augustus 1968 assistent op de afdeling gynaecologie en verloskunde (hoofden destijds: Dr. J.G. Stolk en mevr. A. Luyken-Ozolins) van het Diakonessenhuis te Arnhem. Van oktober 1968 tot februari 1971 werd hij door de Memisa uitgezonden als medical officer in charge van het St. Michaelshospital te Pramso, Ashanti (Ghana). Na terugkeer uit Ghana was hij enige maanden assistent bij H.J. Simons, huisarts te Renesse, om zich vervolgens, in oktober 1971, te vestigen als huisarts te Apeldoorn, aanvankelijk alleenwerkend, vanaf 1974 -na de oprichting ervan- in het gezondheidscentrum "De Maten".

Op 1 oktober 1977 begon hij aan de opleiding tot arts-microbioloog aan het Instituut voor Medische Microbiologie van de Katholieke Universiteit te Nijmegen (opleider: Prof. Dr. J. van der Veen). Na zijn inschrijving in het specialistenregister op 1 oktober 1980 werd hij aan hetzelfde instituut benoemd tot wetenschappelijk hoofdbtenaar. Sedert 22 juni 1981 is hij verbonden aan het Canisius-Wilhelminaziekenhuis te Nijmegen als arts-microbioloog van het Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid te Nijmegen.

STELLINGEN

I

Clyde en Collier vonden leukocytenrosetten rond gelyseerde epitheelcellen bij patiënten en proefdieren met *M. pneumoniae*-pneumonie; op grond van hun onderzoekingen is de hypothese aanvaard, dat "bystander-lysis" (of een soortgelijke allergische reactie) een rol speelt in de pathogenese van pneumonie door *M. pneumoniae*.

W.A. Clyde, jr. (1971) *Infect. Immun.* 4, 757.

A.M. Collier en W.A. Clyde, jr. (1974) *Am. Rev. Resp. Dis.* 110, 765.

II

Foy en Ray vonden geen verband tussen het voorkomen van wiegedood (sudden infant death syndrome) en de frequentie van pneumonie door *M. pneumoniae* bij kinderen onder 5 jaar; er zijn echter argumenten om *M. pneumoniae* niet -zoals zij op grond van hun onderzoek suggereren- uit te sluiten als een mogelijke oorzaak van wiegedood.

H.M. Foy en C.G. Ray (1973) *Am. J. Epidem.* 98, 69.

H.M. Foy *et al.* (1970) *JAMA* 214, 1666.

H.M. Foy *et al.* (1979) *JAMA* 241, 253.

H.M. Foy *et al.* (1979) *J. Inf. Dis.* 139, 681.

D.R. Peterson (1980) *Epidem. Reviews* 2, 97.

III

De sero-epidemiologische resultaten van een onlangs in Nederland verricht onderzoek naar de epidemiologie van bof kunnen niet goed verklaard worden met behulp van de katalytische modellen van Muench; men kan beredeneren dat dit kan berusten op een verschillende antilichaam-respons na primaire en secundaire infecties met bof virus.

J. Wagenvoort (1979) *Epidemiologie van bof in Nederland*, proefschrift Utrecht.

H. Muench (1959) *Catalytic models in epidemiology*, Harvard University Press.

IV

Jaarlijks worden in Nederland ongeveer 300 personen, van wie ruim een derde jonger dan 5 jaar, gedurende gemiddeld 12 dagen in ziekenhuizen opgenomen wegens bof; vooral omdat opname in een ziekenhuis -op zich- voor jonge kinderen als een ernstige "aandoening" moet worden beschouwd, verdient het aanbeveling het huidige beleid in Nederland ten aanzien van vaccinatie tegen bof te herzien.

Gegevens: Stichting Medische Registratie

J. van der Veen (1979) Ned. T. Geneesk. 123, 714.

V

Herhaling van "klassieke" immunologische onderzoeken onder gebruikmaking van moderne serologische methoden -zoals ELISA- kan verrassende resultaten opleveren.

VI

Voor een goed begrip van de betekenis van het voorkomen van IgM-rheumafactor bij -onder andere- reumatoïde arthritis, is het noodzakelijk te onderzoeken onder welke voorwaarden antigenen langdurige vorming van IgM-antilichamen induceren.

VII

Aminoglycosiden kunnen onder meer geïndiceerd zijn ter bestrijding van een sepsis met onbekende verwekker; het verdient aanbeveling deze, zodra de verwekker bekend is -op geleide van het antibiogram- te vervangen door andere antibiotica, ook als de klinische toestand van de patiënt inmiddels is verbeterd.

VIII

Het hyperventilatie-syndroom komt niet alleen in westerse culturen voor; dit gegeven kan bijdragen tot nader inzicht in de pathogenese ervan.

IX

De vicieuze cirkel is dikwijls een geschikt model om de ontwikkeling van -vooral- chronische en recidiverende ziekten te beschrijven.

X

Het verdient aanbeveling om mondhygiënist te betrekken bij de behandeling en verzorging van ernstig zieke patiënten.

XI

De verloskundige zorg in Nederland zou nog verder verbeterd kunnen worden door een goede, gestructureerde samenwerking van de hulpverleners; de ervaring in de eerstelijns gezondheidszorg leert, dat voor een dergelijke samenwerking de hulp van een professionele coördinator onontbeerlijk is.

J.H.J.M. Meuwissen (1979) Medisch Contact 34, 358.

XII

Voor aanhangers van sommige religies is het eten van varkensvlees verboden; de gevolgen van het weer toegenomen gebruik om vlees boven houtskoolvuur te roosteren, illustreren de hygiënische aspecten van deze leerstellingen.

Deuteronomium 14:8

Koran 5:4

XIII

Sommigen verwachten dat de geneeskundige zorg goedkoper wordt als alle artsen in dienstverband zouden werken; het feit dat gezondheidscentra met medewerkers in dienstverband ernstiger financiële problemen hebben dan die met vrije beroepsbeoefenaren, doet het tegendeel verwachten.

Uit de Ziekenfondsraad (1981) Medisch Contact 38, 1171.

XIV

Het vervangen van officiële huisnummers door modieuze cijfers kan de spoed van huisartsen bij nachtelijke spoedvisites verminderen.

